MARIANA CONSIGLIO KASEMODEL

**Seleção de bactérias para biodegradação dos pesticidas
organoclorados DDD, PCP e dieldrin**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

São Carlos

2012

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao
Usuário do SBI/IQSC*

Kasemodel, Mariana Consiglio
Seleção de bactérias para biodegradação dos pesticidas organoclorados
DDD, PCP e dieldrin. -- São Carlos, IQSC, 2012.
129 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2012.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

1. Biodegradação. 2. Organoclorados. 3. Pseudomonas aeruginosa.
I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

*Aos meus amados pais Carlos e Rita e às minhas queridas
irmãs Adriana e Márcia*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo suporte durante o mestrado e principalmente, por sempre me apoiarem em minhas escolhas.

À minha orientadora Prof. Dra. Márcia Nitschke pela dedicada orientação, agradável convivência e principalmente pela sua paciência.

Ao professor André Luiz Meleiro Porto pelo auxílio com os experimentos de cromatografia e pelo fornecimento dos pesticidas e dos solventes utilizados durante o trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Microbiana pela amizade e por fazerem do laboratório um lugar agradável de estar.

A minha amiga Luana, que muito me ajudou durante o mestrado, agradeço principalmente pela grande amizade e companheirismo.

Aos técnicos João e Marília, pela paciência, simpatia, eficiência, e principalmente pela amizade.

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo e pela ajuda nunca negada.

A todos os meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

“A ciência nunca resolve um problema, sem criar pelo menos outros dez”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a seleção de bactérias capazes de biodegradar os pesticidas organoclorados dieldrin, DDD e PCP. Inicialmente, foram realizados os ensaios de tolerância visando à seleção das bactérias degradadoras; posteriormente foram realizados os ensaios de biodegradação em meio líquido utilizando a bactéria selecionada. Dentre as 14 linhagens bacterianas isoladas testadas, selecionou-se a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 por apresentar maior tolerância a todos os pesticidas. Os ensaios de biodegradação foram realizados em diferentes meios de cultura, variando-se a concentração de glicose, a fonte de nitrogênio e a presença de ramnolípídeo. Os ensaios de biodegradação foram realizados determinando-se a concentração de pesticida, a concentração de glicose, o número de células viáveis, e o pH. O meio de cultura que mais favoreceu a biodegradação dos três pesticidas foi o meio com nitrato de sódio e 0,5% de glicose, obtendo-se biodegradação de aproximadamente 50% para cada pesticida após três dias de incubação. Na ausência de glicose, o meio com nitrato de amônio e 0,1% de ramnolípídeo, favoreceu a biodegradação, obtendo-se após 14 dias de incubação 36,8% de biodegradação de dieldrin; 33,7% de DDD e 42,8% de PCP. De uma forma geral, as taxas de biodegradação pela *P. aeruginosa* L2-1 foram maiores em menores concentrações de glicose e na presença de ramnolípídeo. Ao alterar a fonte de nitrogênio foram observados resultados diversos sobre a taxa de biodegradação: na ausência de glicose, o nitrato de sódio favoreceu a biodegradação de PCP, enquanto o nitrato de amônio favoreceu a biodegradação de dieldrin, na presença de glicose observou-se o inverso. A taxa de biodegradação do DDD não foi significativamente alterada ao variar a fonte de nitrogênio. A bactéria selecionada *P. aeruginosa* L2-1 apresentou potencial para biodegradação de pesticidas organoclorados, sendo que as condições nutricionais do meio influenciaram diretamente a biodegradação.

Palavras-chaves: DDD, PCP, dieldrin, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The objective of this work was the selection of bacteria capable of biodegrading the organochloride pesticides dieldrin, DDD and PCP. Initially tolerance tests were conducted in order to select degrading bacteria subsequently, biodegradation tests were carried out in liquid medium using the selected bacteria. Among the 14 bacterial isolated strains, *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 was selected due to its greater tolerance to all pesticides. The biodegradation tests were conducted on different culture media, varying the concentrations of glucose, nitrogen source and presence of rhamnolipid. Biodegradation studies were performed by measuring the concentration of pesticide, the concentration of glucose, the number of viable cell and pH during time. The best medium for the biodegradation of all three pesticides was composed of sodium nitrate and 0.5% glucose, giving approximately 50% yield after three days of incubation. In the absence of glucose, the medium containing ammonium nitrate and 0.1% rhamnolipid improved biodegradation yielding, after 14 days of incubation, 36.8% biodegradation of dieldrin; 33.7% DDD and 42.8% of PCP. In general, the biodegradation rates of pesticides by *P. aeruginosa* L2-1 were greater at lower concentrations of glucose and in the presence of rhamnolipid. Nitrogen source had different effects on the rate of biodegradation: in the absence of glucose, sodium nitrate favored the biodegradation of PCP, whereas ammonium nitrate favored the biodegradation of dieldrin; and in the presence of glucose, it was observed the opposite. The biodegradation rate of the DDD was not significantly altered by the nitrogen source tested. The selected bacteria, *P. aeruginosa* L2-1, showed potential for the biodegradation of organochloride pesticides demonstrating that nutritional conditions has a direct effect on degradation yields.

Keywords: DDD, PCP, dieldrin, *Pseudomonas aeruginosa*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rota de degradação do dieldrin por <i>Pseudomonas</i> sp. _____	31
Figura 2 - Rota de degradação do dieldrin pelo o isolado <i>Pseudonocardia</i> sp. KSF27. _____	32
Figura 3 - Rota de degradação do dieldrin e aldrin por <i>Phlebia</i> sp. _____	33
Figura 4 - Rota de degradação proposta para o metabolismo bacteriano de DDT via descloração. _____	34
Figura 5 - Rota de degradação aeróbica e anaeróbica do DDT. _____	36
Figura 6 - Rota de degradação do PCP por <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> ATCC 39723. PcpC, PCP hidroxilase; PcpD, TCBQ redutase; PcpC, TCHQ desalogenase; GSH, glutatona; PcpA, 2,6-DCHQ dioxigenase; PcpE, MA redutase; PCP, pentaclorofenol; TeCB, tetracoloro-p-benzoquinona; TeCH, tetracoloro-p-hidroquinona; TCH, 2,3,6-tricloro-p-hidroquinona; 2,6-DiCH, 2,6-dicloro-p-hidroquinona; 2-CIMA, ácido 2-cloro-maleilacético; MA, ácido maleilacético; 3-OXO, ácido 3-oxoadipico _____	37
Figura 7 - Coloração de Gram e micrografia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . _____	39
Figura 8 - Estrutura química de (a) mono-ramnolípido e (b) di-ramnolípido. _____	40
Figura 9 - Biodegradação de 3-clorobenzoato por <i>Pseudomonas</i> . _____	45
Figura 10 - Esquema de execução do trabalho. _____	55
Figura 11 - Fluxograma dos experimentos realizados. _____	56
Figura 12 - Tolerância da <i>P. aeruginosa</i> LB1 frente aos pesticidas organoclorados. _____	57
Figura 13 - Tolerância da <i>P. fluorescens</i> 13525 frente aos pesticidas organoclorados. _____	58
Figura 14 - Tolerância da <i>P. aeruginosa</i> L2-1 frente aos pesticidas organoclorados. _____	59
Figura 15 - Tolerância da <i>P. aeruginosa</i> B1-3 frente aos pesticidas organoclorados. _____	60
Figura 16 - Tolerância da <i>P. aeruginosa</i> 27853 frente aos pesticidas organoclorados. _____	61
Figura 17 - Tolerância da <i>P. aeruginosa</i> 7a frente aos pesticidas organoclorados. _____	62
Figura 18 - Tolerância das bactérias marinhas: <i>Arthrobacter</i> sp. 440, <i>Arthrobacter</i> sp. 123, <i>Bacillus</i> sp. 210 e <i>Micrococcus</i> sp. 161 frente ao dieldrin. _____	63
Figura 19 - Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em caldo nutriente. _____	64
Figura 20 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1: 1% glicose e NaNO_3 . _____	65
Figura 21 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS2: 1%+1%+1% de glicose e NaNO_3 . _____	66
Figura 22 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3: 0,5% de glicose e NaNO_3 . _____	67
Figura 23 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4: 1% de glicose e NH_4NO_3 . _____	68
Figura 24 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 . _____	69
Figura 25 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6: NaNO_3 . _____	70
Figura 26 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7: NaNO_3 e 0,1% RL. _____	71
Figura 27 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 . _____	72

Figura 28 - Biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% RL. _	73
Figura 29 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1: 1% de glicose e NaNO_3 . _	75
Figura 30 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS2: 1%+1%+1% de glicose e NaNO_3 . _	76
Figura 31 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3: 0,5% de glicose e NaNO_3 . _	77
Figura 32 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4: 1% de glicose e NH_4NO_3 . _	78
Figura 33 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 . _	79
Figura 34 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6: NaNO_3 . _	80
Figura 35 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7: NaNO_3 e 0,1% RL. _	81
Figura 36 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 . _	82
Figura 37 - Biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% RL. _	83
Figura 38 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1: NaNO_3 e 1% de glicose. _	85
Figura 39 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3: NaNO_3 e 0,5% de glicose. _	86
Figura 40 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4: NH_4NO_3 e 1% de glicose. _	87
Figura 41 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 . _	88
Figura 42 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6: NaNO_3 . _	89
Figura 43 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7: NaNO_3 e 0,1% de RL. _	90
Figura 44 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 . _	91
Figura 45 - Biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% de RL. _	91
Figura 46 - Porcentual de biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1; MS1-MS5: 3 dias de incubação, MS6-MS9: 14 dias de incubação. _	95
Figura 47 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose. _	99
Figura 48 - Espectro de massas identificando o ácido carboxílico fenazina (pico em 38,5 minutos). _	99
Figura 49 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose. _	100
Figura 50 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose. _	101
Figura 51 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose. _	101
Figura 52 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL. _	102
Figura 53 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL. _	103

Figura 54 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL.	103
Figura 55 - Curva de calibração do dieldrin.	116
Figura 56 - Curva de calibração do DDD.	116
Figura 57 - Curva de calibração do PCP.	117
Figura 58 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1 após três dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.	119
Figura 59 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.	119
Figura 60 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose.	120
Figura 61 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO_3 .	120
Figura 62 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO_3 e 0,1% de RL.	121
Figura 63 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 .	121
Figura 64 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1 após 3 dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.	122
Figura 65 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.	122
Figura 66 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS5 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose.	123
Figura 67 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO_3 .	123
Figura 68 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO_3 e 0,1% de RL.	124
Figura 69 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 .	124
Figura 70 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS1 após 3 dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.	125
Figura 71 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS4 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.	125
Figura 72 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO_3 .	126
Figura 73 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO_3 e 0,1% de RL.	126

<i>Figura 74 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por Pseudomonas aeruginosa L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3.</i>	127
<i>Figura 75 - (a) Espectro de massas do pico 1 observado em 5 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (decano).</i>	129
<i>Figura 76 - (a) Espectro de massas do pico 2 observado em 7,5 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (decano).</i>	129
<i>Figura 77 - (a) Espectro de massas do pico 3 observado em 8,1 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (heptano).</i>	130
<i>Figura 78 - (a) Espectro de massas do pico 4 observado em 10,2 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (dodecano).</i>	130
<i>Figura 79 - (a) Espectro de massas do pico 5 observado em 23 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (8-hexadecenal).</i>	131
<i>Figura 80 - (a) Espectro de massas do pico 6 observado em 23,1 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (dietil ftalato).</i>	131
<i>Figura 81 - (a) Espectro de massas do pico 7 observado em 23,35 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido trans-2-dodecanóico).</i>	132
<i>Figura 82 - (a) Espectro de massas dos picos 8 e 9 observado em 38 e 38,1 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca para o pico em 38 minutos (fenazina ácido carboxílico) e (c) espectro de massas do composto sugerido para o pico em 38,1 minutos (fenazina).</i>	133
<i>Figura 83 - (a) Espectro de massas do pico 10 observado em 40,9 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (oxirano).</i>	134
<i>Figura 84 - (a) Espectro de massas do pico 11 observado em 21,9 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido decanóico).</i>	134
<i>Figura 85 - (a) Espectro de massas do pico 12 observado em 30,8 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido ascórbico).</i>	135
<i>Figura 86 - (a) Espectro de massas do pico 13 observado em 34,3 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido 9-octadecanóico).</i>	135
<i>Figura 87 - (a) Espectro de massas do pico 14 observado em 4 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (pentanona).</i>	136

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Propriedades do dieldrin.</i>	20
<i>Tabela 2 - Propriedades do p,p'-DDD.</i>	22
<i>Tabela 3 - Propriedades do PCP.</i>	24
<i>Tabela 4 - Microrganismos capazes de biodegradar pesticidas organoclorados.</i>	29
<i>Tabela 5 - Principais enzimas envolvidas na biodegradação de compostos organoclorados.</i>	41
<i>Tabela 6 - Equipamentos utilizados durante o trabalho.</i>	47
<i>Tabela 7 - Reagentes utilizados nos experimentos.</i>	48
<i>Tabela 8 - Microrganismos utilizados no trabalho e sua respectiva origem.</i>	48
<i>Tabela 9 - Meio de cultura testados para a biodegradação dos pesticidas.</i>	49
<i>Tabela 10 - Condições utilizadas para a determinação da concentração de pesticidas em CG/FID.</i>	53
<i>Tabela 11 - Condições utilizadas para determinação dos metabólitos em CG/MS.</i>	53
<i>Tabela 12 - TS, CMD⁻¹ e CMD⁻² do meio de cultura MS7 e dieldrin: NaNO₃ e 0,1% de ramnolípídeo.</i>	71
<i>Tabela 13 – Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de dieldrin nos diferentes meios de cultura testados.</i>	74
<i>Tabela 14 - TS, CMD⁻¹ e CMD⁻² do meio de cultura MS7 e DDD: NaNO₃ e 0,1% de ramnolípídeo.</i>	81
<i>Tabela 15 – Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de DDD nos diferentes meios de cultura testados.</i>	83
<i>Tabela 16 – Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de PCP nos diferentes meios de cultura testados.</i>	92
<i>Tabela 17 - Relação C:N dos meios testados e a taxa de biodegradação obtida após 3 dias de incubação.</i>	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	PESTICIDAS: ASPECTOS GERAIS	18
2.2	PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	19
2.2.1	<i>Dieldrin</i>	20
2.2.2	<i>Diclorodifenildicloroetano (DDD)</i>	21
2.2.3	<i>Pentaclorofenol (PCP)</i>	23
2.3	BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS POR MICRORGANISMOS	26
2.4	BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS POR MICRORGANISMOS	28
2.4.1	<i>Biodegradação de dieldrin</i>	30
2.4.2	<i>Biodegradação de DDD</i>	33
2.4.3	<i>Biodegradação de PCP</i>	36
2.4.4	<i>Pseudomonas aeruginosa e metabolismo de organoclorados</i>	38
2.4.4.1	Metabolismo de cloro-aromáticos pela via do clorocatecol	42
2.4.4.2	Metabolismo de cloro-aromáticos pela via de enzimas 3-oxoadipato	43
2.4.4.3	Via alternativa para a degradação de 4-halocatecol por <i>Pseudomonas</i> .	43
3	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS	47
4.1.1	<i>Microrganismos</i>	48
4.1.2	<i>Meios de cultura</i>	49
4.2	SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS: ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AOS PESTICIDAS	50
4.3	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS	51
4.4	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	51
4.4.1	<i>Preparo do inóculo</i>	51
4.4.2	<i>Teste de biodegradação</i>	52
4.4.2.1	Extração e quantificação dos pesticidas	52
4.4.2.2	Caracterização dos metabólitos	53
4.5	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE	54
4.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57

5.1	SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS: ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AOS PESTICIDAS	57
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> L2-1	63
5.2.1	<i>Testes de biodegradação</i>	64
5.2.1.1	Biodegradação do dieldrin em diferentes meios de cultura	64
5.2.1.2	Biodegradação de DDD em diferentes meios de cultura	74
5.2.1.3	Biodegradação do PCP em diferentes meios de cultura	84
5.2.1.4	Discussão geral sobre a biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1	92
5.2.1.5	Metabólitos envolvidos na biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1	98
5.3	PRINCIPAIS RESULTADOS	104
6	CONCLUSÕES	105
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	106
	REFERÊNCIAS	107
	APENDICE I	115
	APENDICE II	118
	APENDICE III	128

LISTA DE ABREVIATÖES

CAQI – Centro de Análises Químicas Instrumentais

CDM – Concentração micelar diluída

CG/FID – Cromatografo à gás com detector de chama ionizada

CG/MS – Cromatografo à gas acoplado com espectrômetro de massas

DDE - Diclorodifenildicloroetileno

DDD – Diclorodifenildicloroetano

DDT – Diclorodifenitricloroetano

DMSO – Dimetilssulfóxido

D.O. – Densidade ótica

GOD/POD – Glicose oxidase/glicose peroxidase

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

PHB – poli- β -hidroxibutirato

PCP (ou PCF) – Pentaclorofenol

RL – Ramnolipídeo

TS – Tensão superficial

UFC – Unidades formadoras de colônias

1 Introdução e Justificativa

A qualidade da produção agrícola sempre foi comprometida devido ao surgimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas, tornando-se necessário o uso de agrotóxicos ou pesticidas de diversas classes químicas para o controle destas espécies. Inicialmente, o controle foi realizado com substâncias tóxicas de origem natural, tais como o piretro e a nicotina (JONATAN, 1989). Em 2008, o Brasil alcançou a liderança do mercado consumidor de pesticidas, com investimento de US\$ 7 bilhões e aplicação de 986,5 mil toneladas de pesticidas (LONDRES, 2011). Em 2009, o uso de pesticidas no Brasil se estendeu a 1 milhão de toneladas, o equivalente a 5,2 kg por habitante brasileiro (LONDRES, 2011).

O uso de pesticidas organoclorados começou com a introdução do diclorodifeniltricloroetano (DDT) como inseticida. A sua pronunciada propriedade inseticida, juntamente com sua baixa solubilidade em água, alta persistência no meio ambiente e a sua forma de ação, desconhecida até aquele momento, propiciou resultados notáveis, e seu uso rapidamente se expandiu (KONRADSEN et al., 2004).

A produção em grande escala de DDT iniciou em 1945, e o mesmo foi utilizado na agricultura como pesticida por aproximadamente 30 anos. O uso de pesticidas organoclorados foi intenso durante a segunda metade do século XX. O DDT foi utilizado no combate aos mosquitos transmissores de malária e também foi aplicado na pele de soldados, durante a segunda guerra mundial, para combater piolhos que transmitiam tifo (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Estimou-se que cada cidadão norte-americano ingeriu cerca de 0,28 mg de DDT por dia em 1950, através de alimentos contaminados (ROBERTS, 1999). A solubilidade em lipídeos leva a deposição no tecido adiposo dos seres vivos, permitindo seu deslocamento ao longo da cadeia alimentar (MATUO et al., 1990). O uso excessivo de organoclorados e sua difícil degradabilidade levaram a um acúmulo destes pesticidas no meio ambiente e nos seres vivos.

O problema se agravou quando o DDT, à semelhança de todos os organoclorados, reduziu sua eficácia, incentivando o uso de dosagens cada vez maiores. Por este motivo, procurou-se desenvolver fórmulas que se caracterizavam por maior eficácia e maior biodegradabilidade (TURK, 1989). O poder residual,

considerado como qualidade positiva desses compostos, tornou-se um sério inconveniente. A ação residual dos organoclorados se deve à sua estabilidade química, que lhes proporcionavam prolongada persistência no ambiente (MATUO; LOPES; MATUO, 1990).

Entre 1970 e 1980, muitos países desenvolvidos baniram o uso do DDT na agricultura. Em 2001, durante a Convenção de Estocolmo, foram banidos outros poluentes orgânicos persistentes (POP) clorados, como o aldrin, dieldrin, endrin, toxafeno, mirex e heptacloro, e o uso do DDT foi restringido apenas para o controle de vetores (AHRENS; WEBER, 2009), porém, mesmo após serem banidos os pesticidas organoclorados ainda são encontrados na natureza, devido a sua natureza recalcitrante. Sua presença já foi detectada nos mais variados ambientes, inclusive em elevadas altitudes, como nos Andes chilenos (CIUDAD; MOYANO, 1988) e regiões polares (CONNELL et al. 1999). A permanência no meio ambiente é a razão destes pesticidas ainda serem amplamente estudados, mesmo após a proibição de seu uso.

Os organoclorados podem se ligar aos sedimentos do solo, e assim, sofrer ações de lixiviação e contaminar corpos hídricos, sofrer volatilização e contaminar o ar, ou podem ser absorvidos por microrganismos, vegetais ou animais (CÁCERES et al., 1981). Embora, algumas relações não tenham sido comprovadas, a presença de organoclorados nos seres vivos geralmente está associada ao desenvolvimento de alguma patologia.

Problemas causados pelos organoclorados no meio ambiente, e a consequente intoxicação dos seres vivos, não são raros. Muitos estudos têm associado áreas contaminadas por organoclorados com problemas causados na saúde de seres vivos. Devido aos problemas apresentados, é necessário cada vez mais buscar alternativas para recuperar as áreas contaminadas e consequentemente, reduzir o impacto destes na natureza. A biorremediação é uma alternativa de baixo custo para reduzir a concentração de pesticidas organoclorados acumulados no meio ambiente. Além de possibilitar o tratamento *in situ*, reduzindo gastos com o transporte do material contaminado. Por meio da biorremediação é possível o tratamento em áreas de preservação ambiental e de resíduos considerados de difícil degradação (YONG; MULLIGAN, 2003).

Para tornar processos de biorremediação mais eficazes é importante selecionar microrganismos potencialmente degradadores e estudar as vias

envolvidas na degradação, para o uso dos mesmos ou das respectivas enzimas. Estudos com culturas puras permitem a elucidação dos mecanismos pelo qual o pesticida é metabolizado, o conhecimento dos mecanismos de transporte do pesticida para a célula e suas vias degradativas (PORTO et al., 2011).

Desta forma, o presente trabalho visa selecionar microrganismos capazes de degradar os pesticidas organoclorados dieldrin, pentaclorofenol (PCP) e diclorodifenildicloroetano (DDD). Para isso, foram utilizadas culturas bacterianas obtidas de amostras de solos e de ambiente marinho, além de culturas de coleção mantidas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana. A escolha dos gêneros utilizados neste estudo baseou-se em informações da literatura em relação ao potencial de degradação de organoclorados.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Pesticidas: aspectos gerais

Pesticidas são definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias utilizada na prevenção, destruição, repelência ou mitigação de qualquer peste (FIFRA, 2008).

O cultivo, o transporte e armazenamento de alimentos são afetados por pestes, causando perdas indesejáveis. Em 1999, estimou-se que as perdas mundiais causadas por insetos, ervas daninhas e fungos eram de aproximadamente 35%, sendo 14% devido aos insetos, 11% aos fungos e 10% as ervas daninhas (ROSE; HODGSON; ROE, 1999). Os pesticidas são utilizados para minimizar os prejuízos causados por pestes.

Embora a agricultura exista a mais de dez mil anos (LONDRES, 2011), o uso de pesticidas sintéticos iniciou durante o final da segunda guerra mundial quando Paul Hermann Müller observou que o DDT, sintetizado primeiramente por Zeidler em 1874, era um potente pesticida (KONRADSEN et al., 2004). Esta descoberta rendeu a Müller o Prêmio Nobel de Medicina em 1948, devido à eficiência do DDT no combate de vetores da malária e febre amarela.

Historicamente no Brasil, o uso de pesticidas na agricultura aumentou com a expansão e modernização da agricultura nacional (ALMEIDA et al., 2007). O controle das pragas, que antes era realizado com inimigos naturais, substâncias de origem natural ou métodos mecânicos, foram substituídos pelo uso de compostos químicos sintéticos (ALMEIDA et al., 2007).

Desde a metade do século XX, tanto a agricultura como as pragas domésticas vêm sendo controladas com pesticidas sintéticos. Muitos pesticidas tiveram seu uso banido devido à elevada toxicidade, no entanto, outros entraram em uso.

O uso continuado de pesticidas sintéticos propiciou o surgimento e resistência das pragas a estes compostos (ALMEIDA et al., 2007), acarretando no uso de dosagens mais elevadas, e a consequente acumulação destes compostos no meio ambiente, provocando a contaminação de ecossistemas.

2.2 Pesticidas organoclorados

Os pesticidas organoclorados foram amplamente utilizados durante século XX devido sua grande eficácia. São conhecidos por serem altamente persistentes no meio ambiente. Estes pesticidas incluem os derivados clorados do difenil etano (onde se inclui o DDT, seus metabólitos DDE e DDD, e o metoxicloro); o hexaclorobenzeno (HCB); o grupo dos hexaclorocicloexanos (α -HCH, β -HCH, δ -HCH, γ -HCH ou lindano); o grupo dos ciclodienos (aldrin, dieldrin, endrin, clordano, nonacloro, heptacloro e heptacloro-epóxido), e os hidrocarbonetos clorados (dodecacloro, pentaclorofenol, toxafeno, e clordecona) (MATOLCSY, NÁDASY, ANDRISKA; 1988; MENONE et al., 2000; PATNAIK, 2003).

A maioria dos pesticidas organoclorados é enquadrada como substâncias tóxicas persistentes (STP), estas substâncias compreendem as bifenilas policloradas (BPC), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), o hexaclorobenzeno (HCB), o aldrin, o dieldrin, o endrin, o *p,p'*-DDT, o *p,p'*-DDE, o *p,p'*-DDD, os hexaclorocicloexanos, o endossulfan, o heptacloro e o pentaclorofenol (ALMEIDA et al., 2007). Outros pesticidas organoclorados também são classificados como POP, uma classe mais abrangente que os STP (ALMEIDA et al., 2007), e tiveram seu uso banido durante a Convenção de Estocolmo em 2001.

No Brasil, a primeira portaria que definiu o uso destes compostos foi a Portaria n°. 10 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de 08/03/1985. Através desta portaria é atribuída à DINAL (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos), a elaboração da relação de substâncias com ação tóxica sobre animais e plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários (BRASIL, 1985a). No mesmo ano, a portaria n°. 329 do Ministério da Agricultura proíbe o uso, a comercialização e a distribuição em território nacional de alguns pesticidas organoclorados, dentre eles o aldrin, endrin, DDT e PCP. No entanto, o uso destes pesticidas é excepcionado para aplicação emergencial na agricultura, por órgãos competentes em campanhas de saúde pública; como cupinidas à base de aldrin para emprego em áreas de reflorestamento e florestamento; e de aldrin e dodecacloro em iscas formicidas (BRASIL, 1985b). O heptacloro teve seu uso banido em 30/12/2004 (ALMEIDA, et al. 2007 *apud* BRASIL, 2004); e em 2010 a ANVISA estabelece a retirada do endossulfan do mercado brasileiro em um prazo de três anos (BRASIL, 2010).

2.2.1 Dieldrin

O dieldrin é um hidrocarboneto clorado, que se apresenta no estado sólido em temperatura ambiente, é praticamente insolúvel em água ($186 \mu\text{g L}^{-1}$, 20°C) (WHO, 2003), no entanto, é moderadamente solúvel em solventes orgânicos. Sua temperatura de fusão é aproximadamente 175°C (WHO, 2003). Este pesticida é derivado de ciclodieno, assim como os pesticidas clordano e heptacloro. No entanto o dieldrin apresenta toxicidade mais elevada que ambos, o que é evidenciada na baixa DL_{50} (dose letal para metade da população testada) para ratos, que varia de $50\text{-}87 \text{ mg kg}^{-1}$, em contrapartida, a DL_{50} do clordano e heptacloro são respectivamente, $460\text{-}590 \text{ mg kg}^{-1}$ e $90\text{-}135 \text{ mg kg}^{-1}$ (MATOLCSY, NÁDASY, ANDRISKA; 1988). Algumas propriedades do dieldrin são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades do dieldrin.

Propriedades	Dieldrin técnico
Fórmula molecular	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$
Solubilidade em água em 20°C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	186
Temperatura de fusão ($^\circ\text{C}$)	175
Densidade em 20°C (g cm^{-3})	1,62
Pressão do vapor em 20°C (Pa)	$0,4 \times 10^{-3}$
$\log K_{ow}$ – coeficiente de partição octanol-água	4,6
Odor limiar em água ($\mu\text{g L}^{-1}$)	41
DL_{50} (mg kg^{-1})	50-87

Fonte: WHO (2003).

Sua síntese é obtida através de duas reações Diels-Alder, o que também dá origem ao nome dos pesticidas obtidos, dieldrin e aldrin. Inicialmente é obtido o biciclo-(2,2,1)-2,5-heptadieno pela síntese do acetileno com ciclopentadieno, em seguida, o biciclo-(2,2,1)-2,5-heptadieno reage com hexaclorociclopentadieno, formando 1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-*exo*-1,4-*endo*-5,8-dimetanonaftaleno, conhecido como aldrin (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). A oxidação do aldrin, leva a formação do epóxido 6,7-epóxi-1,2,3,4,10,10-hexacloro - 1 , 4 , 4 a , 5 , 6 , 7 , 8 , 8 a - octahidro - *exo* - 1 , 4 - *endo* - 5 , 8 - dimetanonaftaleno, conhecido como dieldrin (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). Ambos os produtos foram utilizados como pesticidas, no entanto, o dieldrin é

encontrado no solo também devido à oxidação do aldrin (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988).

O dieldrin foi introduzido como inseticida na agricultura e na saúde pública no início dos anos 50 (WHO, 1989). Assim como o DDT, a eficácia deste pesticida contra uma diversidade de insetos, combinado com o seu efeito prolongado, proporcionou a expansão de seu uso. O dieldrin era geralmente mais efetivo e apropriado para uma série de aplicações do que o DDT, por isso substituiu, em alguns casos, o DDT durante a década de 60 (WHO, 1989).

O aldrin foi utilizado extensamente em plantações de milho nos EUA, a conversão do aldrin para sua forma epóxi ocorre no solo, em plantas, insetos, aves e mamíferos (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). Estimou-se que na metade da década de 60, aproximadamente metade das áreas destinadas a plantações de milho nos EUA, eram tratadas com aldrin (DHEW, 1969). O dieldrin também foi utilizado na saúde pública e para uma série de finalidades domésticas, incluindo o controle de cupins e insetos de jardim (STEVENSON et al., 1999).

No Brasil, o caso mais conhecido de contaminação por dieldrin ocorreu na cidade de Paulínia, no interior de São Paulo. A empresa Royal Dutch/Shell Group of Companies, era responsável pela fabricação de Aldrin e Endrin, e pelo processamento de Dieldrin (embora em 1985 a comercialização tenha sido proibida no Brasil, a fábrica continuou suas atividades focada no mercado de exportação até 1990). A contaminação da área da indústria ocorreu devido a três vazamentos em tanques de armazenamento de resíduos industriais (SUASSUNA, 2001). Em 1996, a Shell encomendou um laudo técnico sobre a contaminação do lençol freático fora da área da empresa, foram detectadas concentrações de até $0,25 \text{ pg L}^{-1}$ de dieldrin, e $0,35 \text{ pg L}^{-1}$ de endrin (SUASSUNA, 2001). O Instituto Adolf Lutz também detectou presença de dieldrin e Endrin em alguns pontos de monitoramento do lençol freático no ano de 2000, níveis de até $0,36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram encontrados (SUASSUNA, 2001). O padrão de emissão de dieldrin para águas subterrâneas com a finalidade de consumo humano é de $0,03 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e para recreação é de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2008).

2.2.2 Diclorodifenildicloroetano (DDD)

O DDD é um pesticida organoclorado, provido de dois anéis benzenos com ligações *p*-cloro, unidos por um radical central diclorometilmetileno. O DDD é um sólido cristalino em temperatura ambiente e possui temperatura de fusão

aproximadamente em 109 °C (MERCK INDEX). Apresenta insolubilidade em água, é prontamente solúvel em alguns solventes orgânicos como DMSO (dimetilsulfóxido) e acetato de etila. Suas propriedades físico-químicas não são facilmente encontradas na literatura, porém, devido a sua semelhança com o DDT, que é amplamente conhecido, alguns autores se limitam a dizer que suas propriedades são semelhantes. Algumas propriedades do DDD são mostradas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Propriedades do *p,p'*-DDD.

Propriedades	<i>p,p'</i> -DDD
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄
Solubilidade em água em 25 °C (mg L ⁻¹)	0,090
Temperatura de fusão (° C)	109-110
Densidade em 20 °C (g cm ⁻³)	1,385
Pressão do vapor em 25 °C (Torr)	1,79 10 ⁻³
log K _{ow} – coeficiente de partição octanol-água	6,02
Odor limiar em água (µg L ⁻¹)	Ni
DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)	85,7-4000

Fonte: ATSDR (2002).

O DDT foi primeiramente descrito por Othmar Zeidler em 1873, no entanto sua ação inseticida foi descoberta apenas em 1939 por Paul Müller, fruto de sua pesquisa iniciada em 1935 que tinha como objetivo desenvolver compostos inseticidas para combater traças (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). Müller atribuiu ação inseticida aos compostos com dois anéis benzênicos com ligações *p*-cloro, sendo os anéis unidos por um radical central bivalente, posteriormente, baseado em resultados promissores. Müller se dedicou ao estudo de DDT, que possui o grupo triclorometilmetileno como o radical central bivalente (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988).

O DDT é obtido através da reação de 2,2,2-tricloroetanol com clorobenzeno na presença de ácido sulfúrico como agente condensador. O produto técnico obtido contém uma série de impurezas que incluem os isômeros *o,p'*-DDT e *o,o'*-DDT, 2,2-bis-(*p*-clorofenil)-1,1-dicloroetano (*p,p'*-DDD) e seu isômero *o,p'*-DDD, além do *p,p'*-DDT, que corresponde a aproximadamente 70% do produto (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). O DDD também pode ser obtido através de uma reação de

descloração do DDT, o que o torna um metabólito menos tóxico, pois possui em sua estrutura um átomo de cloro a menos.

O DDD também foi utilizado como pesticida, e seu uso foi banido na maioria dos países na década de 70 (FOGHT et al., 2001), no entanto, o uso de DDT ainda é autorizado para controlar mosquitos transmissores de malária. No Brasil é utilizado na região amazônica para este mesmo fim (D'AMATO; TORRES; ALM, 2002).

Mesmo com seu uso já proibido no Brasil, pesquisadores detectaram a presença de DDT em peixes-espada e cação na costa brasileira (AZEVEDO e SILVA et al., 2006), em leite materno na bacia do rio Madeira na Amazônia (AZEREDO et al., 2007) e em solo contaminado no Mato Grosso (VILLA et al., 2006). Embora, as concentrações encontradas tanto nos peixes quanto no leite materno tenham sido baixas, é importante salientar que o DDD e o DDT possuem caráter cumulativo no organismo, ou seja, o pesticida não é excretado do organismo após o consumo de alimentos contaminados. No caso do solo contaminado no Mato Grosso ocorreu a estocagem indevida de “containers” contendo o pesticida, cujo rompimento; foram detectados na superfície do solo concentrações de até 7300 mg kg⁻¹ de DDT (VILLA et al., 2006). Entre 1997 e 1999 foi detectada a presença de DDT em solos de uma propriedade em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, sendo que a última aplicação do pesticida no local ocorreu em 1990, para controle de leishmaniose (VIEIRA, 1999).

Além das pesquisas realizadas no Brasil, pesquisadores internacionais apontam a presença destes contaminantes na natureza, o que enfatiza sua característica recalcitrante. A presença do DDD ainda é evidenciada em solos, corpos hídricos e alimentos, não só devido ao seu uso, mas também, como o produto da degradação do DDT em condições redutivas (AISLABIE; RICHARDS; BOUL, 1997).

2.2.3 Pentaclorofenol (PCP)

O PCP é um composto aromático clorado, que se apresenta no estado sólido cristalino em temperatura ambiente, com coloração que varia do branco ao marrom, possui um odor fenólico quando aquecido, não é inflamável ou corrosivo (EPA, 2010). Sua temperatura de fusão é aproximadamente 190 °C (EPA, 2010). Embora, sua solubilidade em água seja limitada (80 mg L⁻¹, 20 °C) (EPA, 2010), é solúvel em

solventes orgânicos, como acetato de etila, metanol e DMSO. Algumas propriedades do PCP são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades do PCP.

Propriedades	PCP técnico
Fórmula molecular	C ₆ HOC _l ₅
Solubilidade em água em 20 °C (mg L ⁻¹)	80
Temperatura de fusão (°C)	190-191
Densidade em 20 °C (g cm ⁻³)	1,978
Pressão do vapor em 20 °C (Pa)	0,11 x 10 ⁻³
log K _{ow} – coeficiente de partição octanol-água	5,01
log K _{oc} – coeficiente de partição carbono orgânico	4,5
Odor limiar em água (µg L ⁻¹)	857
DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)	27-175

Fonte: ASTDR (2001).

Este pesticida pode ser produzido a partir de duas vias de síntese, pela cloração gradual de fenóis na presença de catalisador (cloreto de alumínio anidro ou cloreto de ferro) ou através da hidrólise alcalina de hexaclorobenzeno (HCB) (EPA, 2010 *apud* PROUDFOOT, 2003). O HCB pode ser obtido de diversas formas, todas elas são baseadas na cloração de benzeno sob influência de luz ultravioleta ou na presença de um ativador químico (MATOLCSY; NÁDASY; ANDRISKA, 1988). O PCP técnico é composto aproximadamente de 90% de PCP e 10% de contaminantes, estas impurezas consistem de alguns clorofenóis congêneres, dibenzo-*p*-dioxinas cloradas e dibenzofuranos clorados (EPA, 2010). PCP com grau analítico ou puro, geralmente apresenta em sua composição pureza maior ou igual a 98%, (EPA, 2010).

O PCP foi um dos biocidas mais utilizados. Seu uso abrangeu ações inseticidas, herbicidas, algicidas, fungicidas, germicidas, moluscicidas, e foi muito utilizado como preservante de madeiras (EPA, 2010). Seu uso como pesticida foi proibido, porém sua aplicação ainda é permitida em alguns países, como nos Estados Unidos e Brasil, principalmente na preservação de madeiras como postes, dormentes de trilhos de trem e sinais de ferrovia, que ficam expostas à ação de xilófagos, (EPA, 2010; BRASIL, 1985b).

Através de evaporação a partir de superfícies de madeira tratada, o PCP pode alcançar a atmosfera (ASTDR, 2001). Sua presença no solo e em corpos hídricos se deve ao seu uso como pesticida, a derramamentos e a disposição inadequadas de resíduos (ASTDR, 2001). Suas propriedades físico-químicas sugerem que o PCP é pouco volátil, sendo assim, a evaporação para a atmosfera seria mínima enquanto que a contaminação principal seria através da água, aderindo a partículas de óleo (ASTDR, 2001).

Exposições a pequenas concentrações em longo prazo podem prejudicar o fígado, rins, sangue, pulmões, sistema nervoso, sistema imunológico e o trato gastrointestinal (SCHNELLE-KREIS, 2010). Seidler et al. (1996) analisaram resultados de autópsias, associando a presença de PCP no cérebro humano com a incidência da doença de Parkinson.

Estudos realizados na China apontaram a presença de PCP em leite materno e em sedimentos delta do rio Pearl (HONG et al., 2004), mesmo após seu uso ter sido banido no país em 1997.

No Brasil, o caso de contaminação por PCP mais conhecido é o caso da empresa Rhodia instalada em Cubatão, São Paulo. A empresa, que iniciou suas atividades em 1965, produzia pentaclorofenol e pentaclorofenato de sódio. Em 1978 surgiram as primeiras denúncias de funcionários que estavam contaminados com este pesticida, e a CETESB registrou pela primeira vez em seus relatórios o descarte clandestino realizado pela Rhodia. No entanto, não foi adotada medida punitiva (ACPO). Em 1979, a unidade de produção de PCP e pentaclorofenato de sódio em Cubatão foi definitivamente desativada sob pressão dos operários contaminados, porém, a planta de Cubatão produzia além dos pesticidas organoclorados, o solvente orgânico tetracloreto de carbono. Em 1984, a existência de 11 lixões clandestinos que abrigavam organoclorados descartados pela empresa veio a público (ALMEIDA et al., 2007). Devido a esta disposição indevida dos resíduos da fábrica, foram comprovadas a contaminação de peixes, chuchu e frango na Baixada Santista, além da contaminação dos funcionários da fábrica e da população local, que fez uso dos alimentos contaminados (ACPO). De acordo com um dossiê preparado pelo Sindicato de Trabalhadores Químicos, estima-se que desde 1976 a indústria despejou cerca de 12 mil toneladas de resíduos de organoclorados na Baixada Santista. Laudos da CETESB apontaram que a substância hexaclorobenzeno (HCB), aparecia nos lixões químicos da Rhodia em

níveis de até 16% do peso total dos mesmos e o pentaclorofenol, entre 2,0 e 36,8 mg g⁻¹.

2.3 Biodegradação de pesticidas por microrganismos

O destino dos pesticidas no meio ambiente é determinado por fatores bióticos e abióticos. Pesticidas são degradados no meio ambiente principalmente devido à ação de microrganismos ou suas enzimas (ATLAS, 1988).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o termo biodegradação refere-se a “quebra” de uma substância catalisada por enzimas *in vivo* ou *in vitro* (Porto et al., 2011 *apud* IUPAC). A degradação microbiana de componentes químicos no meio ambiente é uma importante rota para a remoção desses poluentes. A biodegradação de pesticidas é frequentemente complexa e envolve uma série de reações bioquímicas.

Embora, muitas enzimas catalisem eficientemente a biodegradação de pesticidas, o entendimento completo da rota de biodegradação frequentemente necessita de maior investigação (PORTO et al., 2011). Muitos pesquisadores que realizaram estudos de biodegradação de pesticidas apresentaram apenas o total de pesticida degradado, e não apresentam os produtos da degradação, assim como sua estabilidade, toxicidade e seu destino no meio ambiente (PORTO et al., 2011).

A velocidade em que diferentes pesticidas são biodegradados é bem variável. Alguns pesticidas, como o DDT e o dieldrin são recalcitrantes na natureza, consequentemente, permanecem no meio ambiente por muito tempo, além de acumularem em cadeias alimentares após sua aplicação no solo (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995 *apud* ABERDEEN, 1993; KANNAN et al., 1994). Segundo Aislabie e Jones (1995) os fatores que influenciam a biodegradação de pesticidas são:

- a) A presença e o número de microrganismos apropriados;
- b) Contato entre o microrganismo e o substrato;
- c) pH, temperatura e salinidade;
- d) Água disponível;
- e) Tensão do oxigênio e potencial redox;
- f) Disponibilidade de nutrientes;
- g) Presença de fontes alternativas de carbono;

- h) Luz;
- i) *Aceptores alternativos de elétrons;*
- j) *Estrutura química do pesticida, peso molecular e grupos funcionais (-Cl, CH₃, -COOH, -OH);*
- k) *Concentração e toxicidade do pesticida;*
- l) *Solubilidade do pesticida em água.*

Para a biodegradação ocorrer, a bactéria ou suas enzimas devem ter contato com o pesticida, e o pesticida ou seus metabólitos devem ser transportados para a célula (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995). Ao ser aplicado no solo, a degradação do pesticida não ocorre instantaneamente, um período de aclimação pode ser requerido para que a população de microrganismos seja adaptada aumentando assim, a taxa de degradação (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995). No entanto, nem todos os microrganismos possuem a habilidade de degradar um pesticida em seu primeiro contato com este; e, em alguns casos, para que a biodegradação ocorra, pode ser necessário algum tipo de adaptação genética (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

Em solos, a biodegradação de pesticidas pode ser limitada pela baixa disponibilidade química do pesticida. Muitos fatores influenciam a disponibilidade, no entanto, na maioria dos casos, a disponibilidade do pesticida é baixa devido a baixa solubilidade em água e/ou sua alta adsorção à matriz do solo. Para que ocorra um contato entre o microrganismo e o substrato, no caso de um pesticida com baixa solubilidade em água, adaptações fisiológicas do microrganismo, como a produção de surfatante são necessários (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

A disponibilidade de nutrientes essenciais, como carbono, nitrogênio, fósforo e oxigênio também pode interferir na taxa de biodegradação de pesticidas. Alguns pesticidas, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético e o carbofuran são utilizados como fonte de carbono por microrganismos, porém, na presença de uma fonte alternativa de carbono, a degradação é menor (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995). Por outro lado, alguns pesticidas, como o DDT, não são utilizados como fonte de carbono e são biodegradados co-metabolicamente (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995). O co-metabolismo requer a presença de uma fonte alternativa de carbono, na qual microrganismos que crescem à custa de um substrato mais prontamente assimilável podem transformar o DDT sem derivar nenhum nutriente ou energia deste processo (BOLLAG; LIU, 1990).

2.4 Biodegradação de pesticidas organoclorados por microrganismos

Moléculas sintéticas como pesticidas frequentemente possuem grupos funcionais, tais como substituintes clorados, que raramente são encontrados na natureza, aumentando a recalcitrância do pesticida. Por exemplo, o DDT é recalcitrante, no entanto, seu análogo não-clorado (difenilmetano) é rapidamente degradado (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995; ALEXANDER, 1977). Outras moléculas que se apresentaram recalcitrantes devido à presença de substituintes clorados incluem o dieldrin e o aldrin (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995). A localização e o número de substituintes clorados em uma molécula de pesticida irá intervir em sua recalcitrância (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

A maioria dos estudos envolvendo biodegradação de pesticidas é realizada com culturas puras de microrganismos. A cultura normalmente é isolada de uma amostra de solo contaminado. O isolado é caracterizado e testado em diferentes concentrações do pesticida estudado. Microrganismos capazes de metabolizar DDT já foram isolados de uma série de habitats, incluindo fezes de animais, solo, esgoto, lodos ativados e, sedimentos marinhos e de água doce (JOHNSON, 1976; LAL; SAXENA, 1982; ROCHKIND-DUBINSKY; SAYLER; BLACKBURN, 1987). Estudos que realizaram crescimento bacteriano com um análogo não-clorado do pesticida, e em seguida, adicionaram o pesticida como fonte alternativa de carbono, também proporcionaram resultados interessantes. Como exemplo, Matsumoto et al. (2008) utilizou o 1,2-epoxiciclohexano (ECH), que possui estrutura análoga ao dieldrin e ao endrin, como substrato para crescimento bacteriano. O ECH se mostrou ser um útil substrato de crescimento para a seleção de bactérias capazes de degradar o dieldrin e o endrin. Através deste método, as bactérias *Burkholderia* sp. e *Cupriavidus* sp. foram selecionadas.

A maioria dos pesticidas organoclorados, como o dieldrin e o aldrin são mais persistentes em ambientes aeróbios (MATSUMOTO et al., 2008). No entanto, a degradação do endrin pode ocorrer em condições anaeróbias (MATSUMOTO et al., 2008 *apud* SIDDARAME DOWDA; SETHUNATHAN, 1977). No caso do DDT, condições anaeróbias são necessárias para que ocorra a formação do metabólito DDD, que é então degradado em condições aeróbias ou anaeróbias (AISLABIE; RICHARDS; BOUL, 1997). Na Tabela 4 são apresentados alguns microrganismos envolvidos na degradação de pesticidas organoclorados.

Tabela 4 - Microrganismos capazes de biodegradar pesticidas organoclorados.

Pesticidas	Estrutura Molecular	Toxicidade	Microrganismos	Referencias
PCP		Classe Ib	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Sphingobacterium chlorophenolica</i>	Stanlake; Finn (1982) Crawford; Mohn (1985) Yang; Lee; Wang (2006)
DDT		Classe II	<i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Sphingobacterium</i> sp.	Wedemeyer (1966) Patil; Matsumura; Boush (1970) Kamanavalli; Ninnekar (2003) Fang et al. (2010)
Lindane		Classe II	<i>Basea thiooxidans</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Pleurotus ostreatus</i>	Pesce; Wunderlin (2004) Benimeli et al. (2007) Rigas et al. (2004)
DDE		n.i.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Bumpus; Powers; Sun (1993)
DDD		n.i.	<i>Trichoderma</i> sp.	Ortega et al.(2010)
Aldrin			<i>Trichoderma viride</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	Patil; Matsumura; Boush (1970)
Dieldrin			<i>Pseudomonas</i> sp.	Matsumura; Boush; Tai (1968)

¹ Classificação de Risco dos Pesticidas (Organização Mundial da Saúde). Classe I é subdividida em duas subclasses: Classe Ia (extremamente perigoso) e Classe Ib (altamente perigoso), Classe II moderadamente perigoso, Classe III ligeiramente perigoso, Classe U são improváveis de causar perigo agudo. O uso de alguns pesticidas foi descontinuado sendo classificados como obsoletos (O). (WHO, 2009). n.i.: não informado.

2.4.1 Biodegradação de dieldrin

Estudos sobre a biodegradação de dieldrin e endrin iniciaram no final da década de 1960. Maule, Plyte e Quirk (1987) relataram que microrganismos anaeróbios de diversos ambientes, como solo, rúmen de ovinos e cama de frango, foram capazes de transformar o dieldrin para produtos monodesclorados.

A transformação de dieldrin para aldrin por redução do epóxido também foi relatada utilizando microrganismos isolados de sedimento de rio (CHIU et al., 2005).. A evidência indireta para a conversão de dieldrin para aldrin por epoxidação foi provado por Lichenstein e Schulz (LAL; SAXENA, 1982). Estes estudos indicaram o potencial de microrganismos anaeróbios na desalogenação redutiva do dieldrin e do endrin (MATSUMOTO et al., 2009).

Embora as vias degradativas do dieldrin e do endrin ainda não tenham sido completamente elucidadas, alguns trabalhos relataram a conversão destes pesticidas para compostos hidrossolúveis e lipossolúveis (MATSUMOTO et al., 2009). O principal metabólito encontrado foi 6,7-*trans*-dihidroxidihidroaldrin em estudos envolvendo *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. (MATSUMURA; BOUSH, 1967), *A. aerogenes* (WEDEMEYER, 1968) e *T. viride* (MATSUMURA; BOUSH, 1968). Esta conversão seria realizada pela enzima epóxido-hidrolase, no entanto não existem estudos específicos envolvendo esta enzima (MATSUMOTO et al., 2009). Além disso, o fotodieldrin, relatado como sendo o produto majoritário da conversão de dieldrin pela ação da luz também foi apontado como sendo metabólito da degradação de dieldrin por microrganismos aeróbios (MATSUMOTO et al., 2009 *apud* MATSUMURA; PATIL; BOUSH, 1970). Nas transformações do endrin, apenas o cetoendrin foi identificado, alguns derivados de aldeídos e cetonas também foram demonstrados (MATSUMOTO et al., 2009 *apud* MATSUMURA et al., 1971).

Alguns estudos demonstraram que o fotodieldrin e o cetoendrin produzidos por microrganismos aeróbios são mais tóxicos que o seu composto original (MATSUMOTO et al, 2009 *apud* GEORGACAKIS KHAN, 1971; BEDFORD et al., 1975).

Matsumura, Boush e Tai (1968) relataram a biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas* sp., isolada de solo contaminado com compostos clorados da antiga fábrica da Shell em Colorado, EUA. Neste estudo foram detectados diversos metabólitos do dieldrin (Figura 1).

Figura 1 - Rota de degradação do dieldrin por *Pseudomonas* sp.

Fonte: MATSUMURA, BOUSH e TAI (1968).

O isolado *Pseudonocardia* sp. KSF27, também apresentou como metabólito o diol-aldrin, a degradação ocorreu em meio mínimo com 5 mg L⁻¹ de dieldrin, sendo que a bactéria metabolizou 73,3% do pesticida (SAKAKIBARA et al., 2011). A rota metabólica proposta para a degradação de dieldrin pelo isolado KSF27 é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Rota de degradação do dieldrin pelo o isolado *Pseudonocardia* sp. KSF27.

Fonte: SAKAKIBARA et al. (2011).

Durante o estudo de biodegradação aeróbia de dieldrin por *P. fluorescens*, Bandala et al (2006) observaram a formação de monoclorodieldrin. A biodegradação ocorreu em 120 horas de experimento tendo o dieldrin como fonte única de carbono, o que propiciou um consumo de 77,8% do pesticida total da amostra.

Resultados semelhantes foram obtidos ao utilizar fungos para biodegradação de dieldrin. Xiao et al. (2011) relataram que fungos do gênero *Phlebia* foram capazes de metabolizar 50% de dieldrin após 28 dias de incubação. Alguns metabólitos encontrados foram semelhantes aos obtidos na degradação de dieldrin por *Pseudonocardia* sp. KSF27 (Figura 3).

Figura 3 - Rota de degradação do dieldrin e aldrin por *Phlebia* sp.

Fonte: XIAO et al. (2011).

Outros estudos de biodegradação de dieldrin foram realizados, porém há pouca informação sobre a rota degradativa utilizada para metabolizar o pesticida e os metabólitos gerados. Na maioria dos estudos realizados, a degradação de dieldrin por microrganismos gera metabólitos estruturalmente relacionados não ocorrendo a mineralização do pesticida (MATSUMURA; BOUSH; TAI, 1968; BANDALA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2009; SAKAKIBARA et al., 2011; XIAO et al., 2011;).

2.4.2 Biodegradação de DDD

A biodegradação de DDT geralmente envolve co-metabolismo. Em condições redutoras, a descloração redutiva é o principal mecanismo de conversão microbiana de *o,p'*-DDT e *p,p'*-DDD (FRIES; MARROW; GRODON, 1969). A reação envolve a substituição de cloro alifático por um átomo de hidrogênio.

Estudos com culturas puras de *E. coli* e *E. aerogenes* obtiveram o DDD como metabólito majoritário, e em quantidades menores: 1,cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno (DDMU); 1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno (DDMS); 2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno (DDNU); 2,2-bis(*p*-clorofenil)etanol (DDOH); bis(*p*-clorofenil) ácido acético (DDA); bis(*p*-clorofenil)metano (DDM); 4,4'-diclorodifenilmetanol (DBH); e 4,4'-diclorobenzofenona (DBP) (LANGLOIS et al., 1970). A via de degradação de DDT por bactérias anaeróbias é mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Rota de degradação proposta para o metabolismo bacteriano de DDT via descloração.

Fonte: AISLABIE, RICHARDS e BOUL (1997).

A degradação se inicia a partir de uma série de reações de descloração, para dar origem ao metabólito DDNU, que é então oxidado para formar DDOH. A oxidação do DDOH gera DDA, que é descarboxilado, formando DDM. DDM é então metabolizado à DBP ou pode ter um dos anéis aromáticos clivado, formando o ácido *p*-clorofenil acético (PCPA). Em condições anaeróbias, a degradação resulta na formação de DBP (AISLABIE; RICHARDS; BOUL, 1997 *apud* PFAENDER; ALEXANDER, 1972).

A biodegradação bacteriana anaeróbia do DDT e de seus metabólitos (providos de dois anéis benzênicos com ligação *p*-cloro), não é eficiente na descloração direta dos anéis, sendo que a degradação ocorre somente no triclorometilmetileno (Figura 4).

O isolado bacteriano *P. aeruginosa* 640x obtido de solos contaminados com DDT foi testado para biodegradação do mesmo em meios com diferentes substratos. Apenas a primeira etapa, que foi a descloração redutiva do DDT para DDD, ocorreu sem a adição de um substrato adicional, todas as outras reações até a formação de difenilmetanol ocorreram exclusivamente em condições de co-metabolismo. A formação de metabólitos dependeu da origem do substrato, sendo evidenciada a

degradação completa do DDT e como metabólitos moléculas descloradas, como o fenilacético, fenilpropionico e ácidos salicílicos. A eficiência de degradação do DDT pelo isolado 640x dependeu da natureza do co-substrato e das condições de aeração, sendo que condições anaeróbias foram necessárias para a formação de DDD (AISLABIE; RICHARDS; BOUL, 1997 *apud* GOLOVLEVA; SKRYABIN, 1981).

Barragán-Huerta et al. (2007) constataram que a biodegradação de DDT por bactérias isoladas de grãos de café foi maior na presença de fonte de carbono adicional. Metabólitos como o DDMU e o DDOH, que ocorrem em ambientes anaeróbios, foram detectados, o que sugere a formação de micronichos anaeróbicos na estrutura porosa do grão de café. Os autores sugeriram que a combinação de ambientes anaeróbios e aeróbios aumentou a degradação do pesticida.

Estudo com a bactéria aeróbica *Alcaligenes eutrophus* A5 foi realizado e concluiu-se que esta foi capaz de metabolizar pequenas concentrações de DDT na presença de elevada densidade celular (NADEAU et al., 1994). Os autores sugeriram que o mecanismo de degradação do DDT envolvia a dioxigenase, levando a formação de derivados dihidroxi, que é em seguida clivado, formando ácido 4-clorobenzóico. Este mecanismo também foi observado na degradação de DDT por *Pseudomonas* sp. e de DDD por *R. eutropha* A5 (KAMANAVALLI; NINNEKAR, 2003; HAY; FOCHT, 1999).

Na Figura 5 são resumidas algumas vias envolvidas na degradação de DDT, mostrando os metabólitos obtidos na degradação aeróbia e anaeróbia.

Figura 5 - Rota de degradação aeróbica e anaeróbica do DDT.

Fonte: AISLABIE; LLOYD-JONES (1995).

O DDE é um metabólito mais recalcitrante do que o DDT, poucos artigos relataram a sua degradação por microrganismos. Bumpus et al. (1993) observaram a degradação de DDE por *P. chrysosporium*. A mineralização do ^{14}C -DDE foi mais lenta do que a do DDT, e o metabólito DBP foi detectado como um dos intermediários da degradação.

Fang et al. (2010) estudaram a biodegradação de DDT por *Sphingobacterium* sp. em diferentes temperaturas, pH, concentrações de DDT e uma fonte adicional de carbono. A taxa de biodegradação foi proporcional à concentração de pesticida, o pH 7 foi o mais favorável para a biodegradação, na temperatura ótima de 30 °C, além disso, a adição de glicose ao meio favoreceu a degradação do DDT.

2.4.3 Biodegradação de PCP

Muitas bactérias capazes de degradar o PCP já foram isoladas, no entanto a via degradativa do PCP foi elucidada em detalhes utilizando a linhagem

Sphingomonas chlorophenolica ATCC 39723 (CRAWFORD; JUNG; STRAP, 2007). Segundo McCarthy, Claude e Copley. (1997), a etapa limitante para a degradação de PCP pela ATCC 39723 é a *para*-hidroxilação do PCP para tetraclorohidroquinona, esta etapa é catalisada pela enzima PCP-4-monooxygenase (ORSER et al., 1993) e pela enzima tetraclorobenzoquinona-redutase (DAI et al., 2003).

Além destas, outras enzimas da via degradativa do PCP já foram caracterizadas. Na Figura 6 abaixo, a via degradativa de PCP por *Sphingobium* (antes denominada de *Sphingomonas*) *chlorophenolicum* é esquematizada, com as respectivas enzimas.

Figura 6 - Rota de degradação do PCP por *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. PcpB, PCP hidroxilase; PcpD, TCBQ redutase; PcpC, TCHQ desalogenase; GSH, glutationa; PcpA, 2,6-DCHQ dioxigenase; PcpE, MA redutase; PCP, pentaclorofenol; TeCB, tetracloro-*p*-benzoquinona; TeCH, tetracloro-*p*-hidroquinona; TCH, 2,3,6-tricloro-*p*-hidroquinona; 2,6-DiCH, 2,6-dicloro-*p*-hidroquinona; 2-CIMA, ácido 2-cloro-maleilacético; MA, ácido maleilacético; 3-OXO, ácido 3-oxoadípico

Fonte: CRAWFORD; JUNG; STRAP (2007).

Nam et al. (2003) isolaram a bactéria *Pseudomonas veronii* PH-05 de um depósito de madeira. O isolado produziu tetraclorocatecol a partir de PCP (NAM et al., 2003). Esta transformação difere de outras transformações observadas com microrganismos que degradam PCP, que universalmente metabolizam o PCP obtendo a hidroquinona clorada como intermediário (CRAWFORD; JUNG; STRAP, 2007). Segundo os autores, investigações mais profundas devem ser realizadas com o isolado *P. veronii* PH-05 para determinar se a via catabólica do PCP é realmente diferente das outras vias propostas por bactérias gram-negativas, ou se o intermediário clorocatecol é formado por uma reação paralela. Wolski et al. (2006) avaliaram a influência de alguns fatores na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa*. Foram testados o efeito do pH e o tamanho do inóculo bacteriano. Os autores verificaram que o pH 6,3 apresentou melhor crescimento bacteriano e que inóculos com elevada densidade celular apresentaram melhor eficiência entre 20-70 h de incubação, no entanto após 100 horas, o PCP havia sido totalmente biodegradado para os três tamanhos de inóculo testado ($1,8 \times 10^6$, $9,04 \times 10^6$ e $4,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹).

2.4.4 *Pseudomonas aeruginosa* e metabolismo de organoclorados

A bactéria *P. aeruginosa* é membro da classe Gama Proteobacteria, da família Pseudomonadaceae e do gênero *Pseudomonas*, que possui 191 espécies (MOORE et al., 2006).

Pseudomonas sp. possui dimensões aproximadas de 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm em forma de bacilos levemente curvados, porém não helicoidais; possuem um ou mais flagelos polares (apenas um flagelo no caso da *P. aeruginosa*) e são Gram negativas (MOORE et al., 2006). São aeróbias, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons, em alguns casos podem utilizar o nitrato (MOORE et al., 2006) ou a arginina (MOORE et al., 2006 *apud* KIIL et al.) como aceptor final alternativo de elétrons, permitindo que o crescimento ocorra anaerobiamente.

A bactéria *P. aeruginosa* pode ser isolada de diferentes habitats, incluindo ambientes aquáticos, solo, e plantas, é também um patógeno humano oportunista, podendo causar infecções hospitalares (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000 *apud* COSTERTON, 1980).

Figura 7 - Coloração de Gram e micrografia eletrônica de varredura (MEV) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Todar's Online Textbook of Bacteriology (disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/>); Pseudomonas Genome Database (disponível em: <http://www.pseudomonas.com/>).

Em condições ambientais específicas, *P. aeruginosa* produz e secreta ramnolipídeos (RL), que são biossurfatantes da classe dos glicolípídeos (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Em cultura líquida, *P. aeruginosa* produz duas formas principais de ramnolipídeos: ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolipídeo) e ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolipídeo) (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000 *apud* RENDELL et al., 1990).

Figura 8 - Estrutura química de (a) mono-ramnolipídeo e (b) di-ramnolipídeo.

A adição de surfatantes é uma estratégia para o tratamento microbiológico de efluentes ricos em hidrocarbonetos de indústrias e refinarias petroquímicas (CHRZANOWSKI et al., 2010 *apud* UYSAL; TURKMAN, 2005; ZHANG et al., 2009). Quando aplicados em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), moléculas de surfatantes anfifílicos geralmente formam agregados com um núcleo hidrofóbico e uma camada hidrofílica exterior (CHRZANOWSKI et al., 2010) também conhecidos como micelas. Já foi observado que o aprisionamento de compostos hidrofóbicos no núcleo micelar é o principal fator responsável pelo aumento na solubilização de pesticidas, alcanos, solventes clorados, ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (CHRZANOWSKI et al., 2010 *apud* AKRAMOVA et al., 2008; WANG; KELLER, 2008; NAYAK et al., 2009). Consequentemente bactérias que produzem os ramnolipídeos possuem uma vantagem para a biodegradação de pesticidas.

As espécies do gênero *Pseudomonas* são agentes valiosos para aplicações biotecnológicas, principalmente devido ao seu metabolismo diversificado (MOORE et al., 2006). As aplicações de *Pseudomonas* compreendem desde o tratamento de resíduos e remediação de áreas impactadas com óleos até seu uso como agentes de crescimento e proteção de plantas. Devido a heterogeneidade de seus habitats, e sua grande adaptação, podem crescer e produzir metabólitos de interesse sem

grande exigência nutricional e ambiental, sendo portanto adequadas para aplicações biotecnológicas (MOORE et al., 2006).

A degradação aeróbia de compostos aromáticos geralmente envolve a ativação sucessiva e modificação, de tal modo que estes são canalizados para alguns compostos intermediários dihidroxilados, como o catecol, gentisato ou protocatecoato, que são então sujeitos a clivagem do anel (MOORE et al., 2006).

Uma variedade de sistemas enzimáticos capaz de ativar os compostos aromáticos é caracterizada por uma ampla especificidade dos substratos e transformam análogos clorados, formando, frequentemente, catecóis clorados (MOORE et al., 2006). Os clorocatecóis são um intermediário ambiental importante e seu destino metabólico pode ser de significância ambiental (MOORE et al., 2006).

Alguns estudos já caracterizaram enzimas envolvidas na biodegradação de organoclorados por *Pseudomonas* sp. Na Tabela (5) abaixo, são apresentadas as principais enzimas envolvidas na biodegradação de organoclorados por *Pseudomonas* sp., o substrato, e o produto obtido.

Tabela 5 - Principais enzimas envolvidas na biodegradação de compostos organoclorados.

Substrato		Enzima		Produtos
3-clorobenzóico	→	Benzoato dioxigenase	→	3- e 5-clorodihidrohidroxibenzóico
3- e 4-clorocatecol	→	Clorocatecol 1,2-dioxigenase	→	cloro- <i>cis,cis</i> -muconato
2- e 3-cloro- <i>cis,cis</i> -muconato	→	Cloromuconato cicloisomerase	→	5- e 4-cloromuconolactona
3-cloro- <i>cis,cis</i> -muconato	→	Cloro muconato cicloisomerase	→	<i>cis</i> -dienelactona
3-cloromuconato	→	Muconato cicloisomerase	→	Protoanemonina
3-cloromuconato	→	Muconato cicloisomerase <i>trans</i> -dienelactona hidrolase	→	Maleilacetato
Maleilacetato	→	Maleilacetato redutase	→	3-oxoadipato

Fonte: MOORE et al. (2006).

2.4.4.1 Metabolismo de cloro-aromáticos pela via do clorocatecol

Os primeiros relatos de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos clorados foram feitos na década de 60 pelo grupo de Alexander e Evans (MOORE et al., 2006). A elucidação de uma via degradativa de cloro aromáticos foi observada utilizando um dos primeiros isolados bacterianos capazes de mineralizar 3-clorobenzoato, a *Pseudomonas* sp. B13 (MOORE et al., 2006 *apud* DORN et al., 1978). A degradação se inicia através da enzima benzoato dioxigenase, formando 3-cloro- e 5-clorodihrodihidroxi benzoato na proporção de 2:1 (MOORE et al., 2006 *apud* REINEKE; KNACKMUSS, 1978a), seguido da desidrogenação, que resulta em 3-cloro- e 4-clorocatecol (MOORE et al., 2006 *apud* REINEKE; KNACKMUSS, 1978b). Os clorocatecóis são degradados por um grupo de enzimas especializadas, através da via de *orto*-clivagem do clorocatecol (MOORE et al., 2006 *apud* DORN; KNACKMUSS, 1978a). O anel do clorocatecol é clivado por uma especificidade ampla de clorocatecol 1,2-dioxigenase, o que produz os correspondentes cloro-*cis,cis*-muconatos (MOORE et al., 2006 *apud* TIDJE et al., 1969; DORN; KNACKMUSS, 1978a; DORN; KNACKMUSS, 1978b; SCHMIDT et al., 1968b; BRODERICK; O'HALLORAN, 1991). A eliminação do substituinte cloro parece ocorrer espontaneamente após a conversão de 2-cloro- e 3-cloro-*cis,cis*-muconato pela cloromuconato cicloisomerase para 5-cloro- e 4-cloromuconolactona, respectivamente (MOORE et al., 2006 *apud* SCHMIDT; KNACKMUSS, 1980a).

Assim como o isolado *Pseudomonas* sp. B13, outras espécies descritas do gênero *Pseudomonas* são capazes de degradar o 3-clorobenzoato por sistemas dioxigenase/desidrogenase (MOORE et al., 2006). Genes para síntese de benzoato dioxigenase já foram evidenciados em *P. putida*; *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (MOORE et al., 2006).

Em contraste com o benzoato dioxigenase, a toluato 1,2-dioxigenase produzida por *P. putida* mt-2, cuja a função natural é a conversão de *m*- e *p*-toluato, também transforma o 4-clorobenzoato (MOORE et al., 2006 *apud* REINEKE; KNACKMUSS, 1978a), principalmente devido a sua analogia estrutural com o *p*-toluato (4-metilbenzoato) (MOORE et al., 2006). Presumidamente, vias envolvendo a degradação natural de substratos contendo substituintes metil, podem frequentemente transformar substratos contendo substituintes cloro, uma vez que ambos os substituintes são de tamanho similar (MOORE et al., 2006).

2.4.4.2 Metabolismo de cloro-aromáticos pela via de enzimas 3-oxoadipato

Diferenças acentuadas foram demonstradas entre as reações catalisadas pelas vias do clorocatecol e de enzimas 3-oxoadipato. Em ambos os casos, clorocatecóis foram clivados produzindo o correspondente *cis,cis*-muconatos (MOORE et al., 2006 *apud* BLASCO et al., 1995). No entanto, muconato e cloromuconato cicloisomerases realizam reações distintas. Considerando que cloromuconato cicloisomerases catalisam uma desalogenação de 3-cloro-*cis,cis*-muconato para formar *cis*-dienelactona, muconato cicloisomerases catalisam uma desalogenação e descarboxilação para formar protoanemonina, um composto de elevada toxicidade (MOORE et al., 2006 *apud* SEEGAL; HOLDEN, 1945). A formação de protoanemonina consiste em uma reação comum realizada por muconato cicloisomerases proteobacteriana, presente em algumas espécies de *Pseudomonas* (MOORE et al., 2006 *apud* VOLLMER et al., 1998).

2.4.4.3 Via alternativa para a degradação de 4-halocatecol por *Pseudomonas*.

Muconato cicloisomerases formam protoanemonina, produto tóxico e recalcitrante (MOORE et al., 2006 *apud* BLASCO et al., 1997). Portanto, a transformação de 4-clorocatecol por enzimas da via 3-oxoadipato consiste em uma rota catabólica indesejada (MOORE et al., 2006 *apud* BLASCO et al., 1997). Uma via degradativa com protoanemonina como intermediário foi proposta para a degradação de 4-clorocatecol pelo isolado *Pseudomonas* sp. RW10 (MOORE et al., 2006 *apud* WITTICH et al., 1999). Este microrganismo apresentou a via do 3-oxoadipato, porém não a via de clorocatecol, logo formou protoanemonina a partir de 3-cloromuconato (MOORE et al., 2006). Similarmente, o isolado *Pseudomonas* sp. MT1 degradou o 4-clorocatecol por uma nova via, que também obteve a protoanemonina como intermediário (MOORE et al., 2006 *apud* PELZ et al., 1999). Ambos os isolados não possuem as enzimas da via do clorocatecol, porém, contêm elevado nível de *trans*-dienelactona hidrolase quando cultivadas em meio contendo cloro-aromáticos (MOORE et al., 2006). Esta enzima foi apontada como sendo a responsável por uma nova via degradativa do 4-clorocatecol (MOORE et al., 2006). O anel aromático do 4-clorocatecol foi clivado pela enzima 1,2-dioxigenase, resultando em 3-cloromuconato, que foi transformado no produto dominante da reação: protoanemonina através da enzima muconato cicloisomerase (MOORE et

al., 2006). A formação de protoanemonina é certamente o final da via de degradação. Mesmo que a *trans*-dienelactona hidrolase não atue sobre o 3-cloromuconato e nem sobre a protoanemonina, a presença simultânea de muconato cicloisomerase e *trans*-dienolactona hidrolase produz concentrações de protoanemonina consideravelmente menores (MOORE et al., 2006 *apud* NIKODEM et al., 2003). Foi sugerido que esta enzima atua sobre a 4-cloromucolactona como um intermediário na transformação de 3-cloromuconato, catalisada pela muconato cicloisomerase, impedindo assim, a formação de protoanemonina e favorecendo a formação de maleilacetato (MOORE et al., 2006). O maleilacetato formado é reduzido em seguida pela maleilacetato redutase. Desta forma, a degradação do clorocatecol pelo isolado MT1 ocorre por uma nova via, consistindo de uma multiplicidade de reações reconhecidas a partir da via 3-oxoadipato (catecol 2-dioxigenase e muconato cicloisomerase), via do clorocatecol (maleilacetato redutase), e *trans*-dienelactona hidrolase (MOORE et al., 2006).

Na Figura 9 são ilustradas as vias de degradação do 3-clorobenzoato por *Pseudomonas* sp., conforme descrito anteriormente.

Figura 9 - Biodegradação de 3-clorobenzoato por *Pseudomonas*.

Fonte: MOORE et al. (2006).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

De acordo com a problemática ambiental apresentada anteriormente, o objetivo principal do trabalho é selecionar bactérias capazes de biodegradar os pesticidas organoclorados dieldrin, DDD e PCP.

3.2 Objetivos específicos

- i. Determinar tolerância de diferentes bactérias frente aos pesticidas organoclorados (dieldrin, DDD e PCP)
- ii. Determinar a eficiência de biodegradação dos pesticidas organoclorados (dieldrin, DDD e PCP) pela bactéria selecionada;
- iii. Determinar a influência da fonte de nitrogênio, da concentração de D-glicose, e da presença de ramnolípídeo na biodegradação;
- iv. Determinar possíveis metabólitos envolvidos na biodegradação.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais utilizados

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). As análises de cromatografia gasosa com detector FID foram realizadas no laboratório de Biocatálise do IQSC. As análises em cromatografia gasosa com espectrometria de massa seletivo foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do IQSC.

Na Tabela 6 abaixo, estão descritos os equipamentos utilizados no trabalho.

Tabela 6 - Equipamentos utilizados durante o trabalho.

Equipamento	Marca/modelo
Potenciometro	Hanna Instruments H1 21
Balança analítica	Shimadzu AUX 220
Espectrofotômetro	Genesys 10uv scanning
Rota-evaporador	Fisatom
Shaker	MaxQ 6000
Centrifuga	Sorvall Legend RT+ centrifuge
Capela de fluxo	Veco bio protector plus 12
Tensiômetro	Attension Sigma 70
Cromatógrafo CG/FID	Shimadzu GC2010 plus
Cromatógrafo CG/MS	Shimadzu GC2010 plus

Na Tabela 7 a seguir, são descritos os reagentes utilizados no trabalho.

Tabela 7 - Reagentes utilizados nos experimentos.

	Reagentes	Marca
Meios de cultura	Agar nutriente	Merck
	Caldo nutriente	Himedia
	Sais do meio de Robert et al.	Synth e Chemis
	D-glicose anidra	Synth
Pesticidas	Dieldrin	Sigma Aldrich
	DDD	Sigma Aldrich
	PCP	Sigma Aldrich
Solventes	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Chemis
	Acetato de etila	Chemis
	Acetona	Chemis
	Acetato de etila HPLC	Chemis
Outros	Sulfato de sódio anidro	Chemis
	Cloreto de sódio	Synth
	Ramnilipídeo	Rhamnolipid Inc. 25%
	Kit de GOD/POD	LaborLab

4.1.1 Microrganismos

Foram testados 14 isolados bacterianos, conforme a Tabela 8 abaixo. As bactérias do gênero *Pseudomonas*, foram obtidas de solo contaminado com hidrocarbonetos (BENINCASA et al., 2002; COSTA, 2010). As bactérias de origem marinha foram isoladas da região de São Sebastião, São Paulo (MENEZES et al., 2010). A escolha dos gêneros utilizados neste estudo baseou-se em informações da literatura em relação ao potencial dos mesmos na degradação de organoclorados.

Tabela 8 - Microrganismos utilizados no trabalho e sua respectiva origem.

Código	Microrganismo	Origem
LBI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo contaminado com petróleo
B1-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de "landfarming"
7a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de "landfarming"
L2-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de "landfarming"
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangue
ATCC 13525	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tanque de pre-filtragem
B123	<i>Arthrobacter</i> sp.	Ambiente marinho
B440	<i>Arthrobacter</i> sp.	Ambiente marinho
B119	<i>Bacillus</i> sp.	Ambiente marinho
B153	<i>Bacillus</i> sp.	Ambiente marinho
B210	<i>Bacillus</i> sp.	Ambiente marinho
B155	<i>Micrococcus</i> sp.	Ambiente marinho
B150	<i>Micrococcus</i> sp.	Ambiente marinho
B161	<i>Micrococcus</i> sp.	Ambiente marinho

Os microrganismos foram estocados em freezers a -20°C e -80°C em caldo nutriente adicionado de 20% de glicerol. Todos os experimentos foram iniciados a partir de uma cultura estoque -20°C .

4.1.2 Meios de cultura

Para os ensaios de crescimento bacteriano, foi utilizado o caldo nutriente, constituído de peptona, cloreto de sódio, extrato de carne e extrato de levedura. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ (25°C).

O meio sólido utilizado foi o ágar nutriente, constituído de agar, peptona, cloreto de sódio, extrato de carne e extrato de levedura. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ (25°C).

Para os ensaios de biodegradação foi utilizado o meio mineral de Robert et al. (1989) com a seguinte composição: 2 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 2 g L^{-1} de K_2HPO_4 , $0,5\text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1\text{ g L}^{-1}$ de KCl , $0,01\text{ g L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,01\text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2 , 2 g L^{-1} de NaNO_3 , $75\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de H_3BO_3 , $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $77\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $90\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. A concentração de glicose e a fonte de nitrogênio do meio foram alteradas para verificar a influência destes na biodegradação dos pesticidas. Testes com ramnolipídeo também foram realizados. Na Tabela 9 a seguir estão as variações que foram realizadas para os testes de biodegradação.

Tabela 9 - Meio de cultura testados para a biodegradação dos pesticidas.

Meio de cultura	Concentração de glicose	Fonte de Nitrogênio	Ramnolipídeo (RL)
MS1	1%	NaNO_3	Sem adição
MS2	1% + 1% + 1%	NaNO_3	Sem adição
MS3	0,5%	NaNO_3	Sem adição
MS4	1%	NH_4NO_3	Sem adição
MS5	0,5%	NH_4NO_3	Sem adição
MS6	-	NaNO_3	Sem adição
MS7	-	NaNO_3	0,1%
MS8	-	NH_4NO_3	Sem adição
MS9	-	NH_4NO_3	0,1%

Os pH dos meios foram ajustados para $7,0 \pm 0,1$. Todos os meios utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Os pesticidas foram dissolvidos em DMSO, na concentração de 50 mg mL⁻¹ e foram adicionados aos meios de cultura previamente esterilizados. As soluções de pesticidas foram mantidas sob refrigeração, na faixa de temperatura 5 - 7 °C.

4.2 Seleção das bactérias: ensaios de tolerância aos pesticidas

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de cultura estoque armazenada a - 20 °C, que foram transferidas para placas contendo ágar nutriente e incubadas por 24 horas à 30 °C. Uma alíquota da cultura bacteriana (24 h) foi adicionada a solução de NaCl 0,86%, ajustando-se a absorbância da suspensão para $0,1 \pm 0,01$ (610 nm) que corresponde a uma população de aproximadamente 10⁸ bactérias mL⁻¹ com base na escala McFarland, obtendo-se assim o inóculo padronizado.

Os testes de crescimento na presença dos pesticidas foram realizados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio caldo nutriente adicionados de 5, 10, 20, 50 e 100 µg mL⁻¹ de DDD, PCP e dieldrin individualmente. Em cada tubo de ensaio foi adicionado um volume conhecido de solução de pesticida dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), de tal forma a obter no tubo de ensaio a concentração final desejada. Adicionou-se 0,5 mL da suspensão bacteriana padronizada, obtendo-se assim a uma concentração bacteriana de 2 10⁷ bactérias mL⁻¹ por tubo de ensaio. Após a adição do inóculo, os tubos foram deixados em repouso em temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) durante 24 horas, e em alguns casos, quando não houve crescimento, durante 48 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata e para cada concentração testada foi feito um controle abiótico (sem bactéria) com a mesma concentração de pesticida, estas amostras foram utilizadas como branco nas medidas de absorbância, uma vez que a adição do pesticida nas amostras formou emulsão. Cultivos sem pesticida foram utilizados como controle positivo para comparar o crescimento bacteriano na ausência de pesticida.

O crescimento bacteriano foi acompanhado por medidas de absorbância no comprimento de onda de 610 nm, utilizando-se o controle abiótico em cada concentração como branco. Para a seleção do microrganismo a ser utilizado nas etapas posteriores optou-se por utilizar a bactéria foi capaz de crescer na presença dos três pesticidas até as mais altas concentrações. Para esta escolha, levou-se em consideração o tempo de incubação e o valor da absorbância da amostra nas cinco diferentes concentrações de pesticida. Os próximos ensaios foram realizados com a

bactéria *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, selecionada a partir do ensaio de tolerância.

4.3 Determinação do número de células viáveis

Visando a padronização do inóculo bacteriano para os ensaios de biodegradação foi determinado o número de células viáveis (UFC mL⁻¹) da cultura relacionando-se com o valor de absorbância. A bactéria selecionada na etapa anterior, *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, foi inoculada em caldo nutriente incubando-se por 24 horas, em temperatura constante de 30 °C e agitação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, e para cada alíquota foi medida a absorbância e realizada diluições sucessivas (1 mL da amostra foi diluído em 9 mL de solução salina, 1 mL desta diluição foi diluída em 9 mL de solução salina, e assim sucessivamente). De cada diluição, foram retiradas amostras de 15 µL que foram depositadas em placas de ágar nutriente. Os ensaios de contagem foram realizados em triplicata utilizando a técnica de microgotas (MILES; MISRA, 1938).

4.4 Ensaios de biodegradação

4.4.1 Preparo do inóculo

O inóculo bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 foi preparado a partir de culturas estoques, armazenadas a -20 °C, que foram transferidas para placas contendo ágar nutriente e incubadas por 24 horas à 30 °C. Uma alíquota da cultura foi transferida com alça de inoculação para erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de caldo nutriente incubando-se a temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm, durante 8 horas para que a cultura atingisse o final da fase exponencial de crescimento. A cultura resultante foi submetida à centrifugação em 10000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e, o sedimento celular, suspenso com solução de NaCl 0,86%. A amostra foi centrifugada novamente, nas mesmas condições. A biomassa bacteriana foi diluída com solução salina, de tal forma a obter a absorbância de $0,4 \pm 0,01$ (610 nm), que corresponde a uma população de 10^9 UFC mL⁻¹.

4.4.2 Teste de biodegradação

Os testes de biodegradação foram realizados em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio salino de Robert et al. (1989) modificado de acordo com a Tabela 9 (anterior) e 1 mL (2%) da suspensão bacteriana preparada conforme item anterior (item 4.4.1).

Foram testadas as maiores concentrações de pesticida nas quais a *P. aeruginosa* L2-1 foi capaz de crescer no teste de seleção (item 4.2), no caso, 50 mg L⁻¹ para os três pesticidas. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 30 °C. Para cada tempo de amostragem, um controle negativo (meio de cultura e pesticida) foi cultivado nas mesmas condições para monitorar degradação abiótica.

Em cada tempo de amostragem do teste de biodegradação foi realizada contagem de células viáveis, conforme descrito no item 4.3. O pH da cultura foi determinado em potenciômetro para evidenciar possível efeito sobre a biodegradação. A concentração de glicose (MS1-MS5) foi determinada conforme descrito item 4.5. A tensão superficial (TS) e a concentração micelar diluída (CMD) dos meios (as amostras foram previamente centrifugadas por 15 minutos em 10⁴ rpm para separar a população microbiana, evitando interferentes nas medidas de TS e CMD) adicionados de RL (MS7 e MS9) foram determinadas utilizando tensiômetro. A quantificação do pesticida na amostra e a caracterização dos metabólitos estão descritos nos itens seguintes.

4.4.2.1 Extração e quantificação dos pesticidas

Para quantificar o pesticida, as amostras (50 mL) foram submetidas a extração com acetato de etila (3 × 50 mL). A fase orgânica foi adicionada de Na₂SO₄ anidro e filtrada em algodão. Após a filtragem a amostra foi submetida à secagem em evaporador rotativo a vácuo. O extrato obtido foi analisado em cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama (CG/FID) (ORTEGA et al., 2010). O cromatógrafo a gás utilizado foi Shimadzu GC2010plus com detector FID acoplado, coluna DB5 fundida com sílica (J&W Scientific 30 m × 0,25 mm × 0,25). A temperatura do forno foi programada para iniciar a 90 °C, e ser elevada à uma taxa de 10 °C min⁻¹ até atingir 270 °C, quando foi mantida por 7 minutos. A temperatura de injeção utilizada foi de 250 °C; a razão de fracionamento da amostra para injeção

foi 1:5 e o gás nitrogênio foi utilizado como gás de arraste. A concentração de pesticida foi comparada com curvas analíticas construídas para cada pesticida, com concentrações variando entre 0,5 - 3 mg mL⁻¹ (apêndice I). Na Tabela 10 abaixo, encontram-se as condições utilizadas para determinar as concentrações de pesticida nas amostras com CG/FID.

Tabela 10 - Condições utilizadas para a determinação da concentração de pesticidas em CG/FID.

Temperatura do forno da coluna (°C)	50
Temperatura de injeção (°C)	250
Volume de injeção (µL)	1
Pressão (kPa)	53,5
Fluxo total (mL min ⁻¹)	11,7
Fluxo na coluna (mL min ⁻¹)	1,44
Velocidade linear (cm s ⁻¹)	43,6
Fluxo de purga (mL min ⁻¹)	3,00
Razão de fracionamento	5.0

4.4.2.2 Caracterização dos metabólitos

Os metabólitos foram caracterizados em cromatógrafo a gás acoplado com detector de massa seletivo no modo de ionização de elétron (EI). A coluna utilizada foi a DB5 fundida com sílica e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50 °C, e ser elevada à uma taxa de 5 °C min⁻¹ até atingir 270 °C, quando foi mantida por 5 minutos. A temperatura de injeção utilizada foi de 250 °C; a razão de fracionamento da amostra para injeção foi 1:50. Na Tabela 11 abaixo, encontram-se as condições utilizadas para determinar os metabólitos em CG/MS.

Tabela 11 - Condições utilizadas para determinação dos metabólitos em CG/MS.

Temperatura do forno da coluna (°C)	50
Temperatura de injeção (°C)	250
Volume de injeção (µL)	1
Pressão (kPa)	53,5
Fluxo total (mL min ⁻¹)	54,0
Fluxo na coluna (mL min ⁻¹)	1,00
Velocidade linear (cm s ⁻¹)	36,3
Fluxo de purga (mL min ⁻¹)	3,00
Razão de fracionamento	50.0

4.5 Determinação de glicose

Como na maioria dos casos a biodegradação de pesticidas é realizada co-metabolicamente, julgou-se necessário acompanhar o consumo de glicose durante o experimento.

A glicose presente no meio foi determinada pelo método enzimático glicose oxidase/peroxidase utilizando kit comercial (LaborLab). O kit possui 4 soluções: reativo padrão (solução de glicose 100 mg dL⁻¹), reativo enzimático (glicose oxidase ≥ 1KU mL⁻¹, peroxidase ≥ 0,15 KU mL⁻¹), reativo de cor (1) (4-aminofenazona 0,025 mol L⁻¹, tampão TRIS 0,92 mol L⁻¹) e reativo de cor (2) (fenol 0,055 mol L⁻¹).

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose do meio, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando antipirilquinonimina, responsável pela coloração vermelha. A absorbância da amostra medida no comprimento de onda de 505 nm é diretamente proporcional à concentração de glicose na mesma.

Foram preparados três tubos de ensaio contendo 2 mL de reativo de trabalho: o tubo branco (sem adição - controle), o tubo padrão contendo 2 µL de padrão de glicose (100 mg dL⁻¹) e o tubo amostra contendo 2 µL do sobrenadante da amostra da cultura microbiana (as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em 10⁴ rpm, evitando que açúcares presente nas células interferissem nas medidas de GOD/POD). Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 37 °C. Após 10 minutos foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (505 nm). O valor da concentração de glicose no meio foi determinado a partir da equação abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Glicose (mg dL}^{-1}\text{)} &= D \times f_c \\ f_c &= \frac{100 \text{ mg dL}^{-1}}{P} \end{aligned}$$

Sendo D é a absorbância da amostra e P é a absorbância do padrão.

4.6 Análise dos resultados

Os ensaios de tolerância aos pesticidas organoclorados foram realizados em duplicata e expressos como média de duas repetições independentes. Os demais ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média de três repetições independentes.

A seguir, um esquema simplificado dos ensaios realizados durante o trabalho (Figura 10) e o fluxograma dos experimentos realizados (Figura 11).

Figura 10 - Esquema de execução do trabalho.

Figura 11 - Fluxograma dos experimentos realizados.

5 Resultados e Discussão

5.1 Seleção das bactérias: ensaios de tolerância aos pesticidas

Entre as bactérias testadas quanto a tolerância frente a cada pesticida organoclorado, destacaram-se as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Bactérias deste gênero são conhecidas por sua versatilidade, e como a maioria das linhagens testadas neste trabalho foram isoladas de ambientes contaminados, é possível que estas tenham adquirido maior habilidade de sobreviver em ambientes hostis.

Figura 12 - Tolerância da *P. aeruginosa* LB1 frente aos pesticidas organoclorados.

A *P. aeruginosa* LB1 (Figura 12) apresentou tolerância significativa frente ao DDD e ao PCP, embora seu crescimento tenha sido inferior em relação ao controle. Observa-se que o aumento da concentração de DDD e PCP não afetou o crescimento celular. Já na presença de dieldrin, o crescimento bacteriano foi inferior em comparação aos demais pesticidas, mesmo em baixas concentrações como 5 mg L⁻¹. Com 50 mg L⁻¹ de dieldrin o crescimento celular foi aproximadamente um

terço em comparação ao crescimento na presença de PCP na mesma concentração, e em 100 mg L^{-1} praticamente não houve desenvolvimento celular, sugerindo a toxicidade do pesticida a esta linhagem bacteriana.

A *P. fluorescens* 13525 (Figura 13) apresentou tolerância aos três pesticidas nas menores concentrações. Em 20 mg L^{-1} de PCP observa-se significativa redução no crescimento celular, e em 50 mg L^{-1} de PCP não foi observado crescimento celular, sugerindo toxicidade celular. Para o DDD e o dieldrin observou-se pequena ou nenhuma redução no crescimento celular, mesmo em elevadas concentrações.

Figura 13 - Tolerância da *P. fluorescens* 13525 frente aos pesticidas organoclorados.

A *P. aeruginosa* L2-1 (Figura 14) apresentou tolerância a todas as concentrações testadas, para os três pesticidas. Observou-se que seu crescimento na presença dos pesticidas foi inferior em comparação ao controle positivo, no entanto, mesmo em elevadas concentrações, o crescimento bacteriano se manteve praticamente constante, observando apenas decréscimo no crescimento em 50 mg L^{-1} de PCP e em 100 mg L^{-1} de DDD.

Figura 14 - Tolerância da *P. aeruginosa* L2-1 frente aos pesticidas organoclorados.

A *P. aeruginosa* B1-3 (Figura 15) apresentou tolerância ao dieldrin até a concentração de 20 mg L⁻¹, em 50 mg L⁻¹ de dieldrin seu crescimento se torna ligeiramente inferior, e em 100 mg L⁻¹ seu crescimento é praticamente a metade do crescimento no controle positivo. Quanto ao DDD, a bactéria apresentou menor crescimento, em comparação ao controle positivo e ao dieldrin, no entanto, este crescimento inferior foi praticamente constante em todas as concentrações testadas. Na presença de PCP, a bactéria manteve seu crescimento constante, com uma pequena diferença nas concentrações entre 5 e 10 mg L⁻¹, que pode ser devido a erros analíticos durante a medida da densidade óptica.

Figura 15 - Tolerância da *P. aeruginosa* B1-3 frente aos pesticidas organoclorados.

A *P. aeruginosa* 27853 (Figura 16) apresentou tolerância em todas as concentrações de PCP. A bactéria apresentou sensibilidade ao dieldrin, em 100 mg L⁻¹ não foi observado crescimento.

Figura 16 - Tolerância da *P. aeruginosa* 27853 frente aos pesticidas organoclorados.

A *P. aeruginosa* 7a (Figura 17), assim como a 27835, foram as representantes do gênero *Pseudomonas* que apresentaram menor crescimento bacteriano, mesmo sem o pesticida, a densidade ótica do controle positivo para ambas foi um pouco superior a 0,2. No caso do dieldrin, a *P. aeruginosa* 7a, apresentou tolerância até a concentração de 20 mg L⁻¹, já em 50 mg L⁻¹ sua densidade ótica diminui aproximadamente pela metade. O aumento da concentração de PCP e DDD causou um decréscimo na densidade celular. Na concentração de 100 mg L⁻¹ não foi observado crescimento, sugerindo toxicidade destes pesticidas para esta linhagem.

Figura 17 - Tolerância da *P. aeruginosa* 7a frente aos pesticidas organoclorados.

As bactérias de origem marinha apresentaram pouco ou nenhum crescimento na presença dos pesticidas organoclorados durante 24 horas de cultivo. Algumas bactérias marinhas apresentaram resultados de crescimento na presença de dieldrin, principalmente após 48 horas de incubação, os resultados obtidos para estas bactérias estão representados na Figura 18.

Dentre as bactérias marinhas, a *Micrococcus* sp. 161, apresentou elevado crescimento celular após 48 horas de incubação, principalmente até a concentração de 20 mg L⁻¹ de dieldrin, onde pode-se observar que houve pouco decaimento da densidade celular ao se comparar com a densidade ótica na concentração 0 (sem pesticida). No entanto, já em 50 mg L⁻¹ sua densidade celular é metade da D.O. do controle.

Figura 18 - Tolerância das bactérias marinhas: *Arthrobacter* sp. 440, *Arthrobacter* sp. 123, *Bacillus* sp. 210 e *Micrococcus* sp. 161 frente ao dieldrin.

A partir dos dados obtidos neste ensaio, selecionou-se a *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 para os ensaios posteriores, pois esta apresentou crescimento significativo em todas as concentrações testadas de DDD, PCP e dieldrin. Entretanto, outras bactérias apresentaram resultados interessantes, como a *Pseudomonas aeruginosa* B1-3.

5.2 Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* L2-1

Na Figura 19, observa-se a relação do crescimento bacteriano com a densidade ótica da cultura de *P. aeruginosa* L2-1. As primeiras duas horas de cultivo representam a fase lag, quando ocorre pouco crescimento celular. Da segunda hora até aproximadamente 12 horas de cultivo, a bactéria passa por uma fase de crescimento intenso, denominada de fase log. É possível notar a relação similar da densidade ótica com o número de células viáveis até aproximadamente 12 horas de cultivo, quando a densidade ótica se mantém crescente, enquanto o número de células viáveis se mantém constante, e logo decresce. Isto indica que a bactéria

atingiu a fase estacionária, o número de células viáveis atinge um valor aproximadamente constante.

A fase de crescimento exponencial ou fase log é a fase onde as células atingem o máximo de sua atividade metabólica e o maior número de células ativas é obtido (MADIGAN; MICHAEL; PARKER, 2010). Observa-se na curva de crescimento (Figura 19), que após 8 horas de cultivo as células atingiam a fase final de crescimento exponencial, portanto, os ensaios de biodegradação foram realizados com inóculo bacteriano cultivado nestas condições.

Figura 19 - Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em caldo nutriente.

5.2.1 Testes de biodegradação

5.2.1.1 Biodegradação do dieldrin em diferentes meios de cultura

Em meio de cultura MS1 (Figura 20), a bactéria consumiu cerca de 80% (8 g L⁻¹) da fonte preferencial de carbono em 24 horas de ensaio, a fase de crescimento exponencial também ocorreu durante este período e o pH do meio foi levemente acidificado. A degradação do dieldrin ocorreu até 72 horas de ensaio, o consumo do pesticida neste período foi de 49,2% e a glicose foi totalmente consumida. Após o

primeiro dia de incubação, o ambiente básico relatado após o segundo dia de incubação não foi prejudicial às células.

Figura 20 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1: 1% glicose e NaNO_3 .

Na Figura 20 é possível observar que a fase de crescimento exponencial das células coincidiu com o consumo majoritário de glicose. Na ausência de glicose, após 72 horas de ensaio, a degradação do dieldrin, também cessou. Neste período as células passaram para a fase estacionária e o meio de cultura apresentou um pH elevado.

Para verificar se a degradação do dieldrin estava relacionada a presença de glicose no meio foi realizado ensaio com meio MS2 (Figura 20). Desta forma, foram realizados dois pulsos de glicose, um no tempo 2 dias, após o esgotamento da glicose, e outro pulso no tempo 3 dias, quando a concentração de glicose no meio era inferior a 2 g L⁻¹. Foi necessário reajustar o pH da amostra no terceiro dia de incubação, pois este era inferior a 4, o que poderia influenciar no crescimento celular.

Figura 21 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS2: 1%+1%+1% de glicose e NaNO_3 .

De acordo com a Figura 21, é possível verificar que a adição de glicose no meio não influenciou a biodegradação do pesticida, uma vez que em meio MS1 a biodegradação ocorreu de forma semelhante. No entanto, a primeira adição de glicose influenciou no pH do meio, provavelmente devido à formação de metabólitos ácidos. O crescimento celular foi ligeiramente superior que em meio MS1, o que era de se esperar, uma vez que havia mais substrato disponível para o crescimento dos microrganismos. Em três dias de experimento, após o primeiro pulso de glicose, foram consumidos 29,6% de dieldrin da amostra. Após o segundo pulso de glicose, em 5 dias de experimento, a concentração de dieldrin no meio era de 1,60 mg (60% do inicial).

Em meio MS3 (Figura 22), verificou-se a biodegradação ao reduzir a concentração de glicose para 0,5%. Constatou-se que a redução da concentração de glicose no meio permitiu que a biodegradação ocorresse mais rapidamente ao comparar a taxa de biodegradação do meio MS1 com a do meio MS3 em 24 horas de incubação. A biodegradação ocorreu principalmente na fase logarítmica de

crescimento celular, após 24 horas de incubação, 76,4% da glicose e 43,2% de dieldrin haviam sido consumidos. A redução da concentração de dieldrin em 72 horas de ensaio foi de 49,2%, ou seja, igual ao obtido para o meio MS1, isto implica que a redução da concentração de glicose no meio não afetou diretamente a biodegradação de dieldrin.

Figura 22 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3: 0,5% de glicose e NaNO_3 .

Os meios MS4 e MS5 foram os que menos favoreceram a biodegradação de dieldrin na presença de glicose. Em meio MS4 (Figura 23), a biodegradação foi maior no primeiro dia de incubação, quando foram consumidos 35% do dieldrin da amostra. Após 24 horas de incubação praticamente não houve mais consumo do pesticida, e em 72 horas a população celular foi eliminada. O pH da amostra não sofreu mudanças significativas e a glicose do meio foi totalmente consumida em 72 horas de incubação.

Figura 23 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4: 1% de glicose e NH_4NO_3 .

Em meio MS5 (Figura 24) a degradação do dieldrin ocorreu de forma semelhante que no meio MS4, ou seja, nas primeiras 24 horas de incubação. Em 72 horas não havia mais células viáveis, a biodegradação foi de aproximadamente 35%, e a glicose do meio foi totalmente consumida. A alteração da concentração de glicose de 1% para 0,5% nos meios MS4 e MS5 não afetou a degradação de dieldrin, no entanto, a utilização do nitrato de amônio em substituição ao nitrato de sódio como fonte de nitrogênio foi prejudicial ao crescimento celular.

Figura 24 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 .

Durante os ensaios em meio de cultura MS6 (Figura 25), 16,8 % do pesticida foi consumido após 28 dias de incubação. O consumo ocorreu principalmente entre os dias 7 e 21. Nota-se que a degradação do pesticida ocorre lentamente, uma vez que a única fonte de carbono disponível era o pesticida, indicando necessidade de adaptação a este substrato. Mesmo após 28 dias de incubação, as células continuaram viáveis, indicando possivelmente o uso de uma reserva interna celular para o sua manutenção, ou o consumo do pesticida como fonte de carbono. Nos controles abióticos, observou-se que não houve perdas de pesticida, o que reforça o consumo bacteriano. O pH da amostra se manteve inalterado durante todo o experimento.

Figura 25 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6: NaNO₃.

Em meio MS7 (Figura 26), observou-se crescimento microbiano durante 7 dias. O consumo de dieldrin ocorreu principalmente nos 14 dias de incubação, e após 28 dias de incubação, o consumo total de dieldrin foi de 29,3%. Nos primeiros 7 dias de incubação a taxa de biodegradação foi maior, sugerindo uma relação da biodegradação com o crescimento celular. A adição de ramnolípídeo favoreceu a degradação (quando comparado com o meio MS6), pois provavelmente a adição do surfatante disponibilizou o dieldrin, que é pouco solúvel em água, para as células. Entretanto, também é possível que o biossurfatante tenha sido utilizado como fonte de carbono, favorecendo o crescimento celular. Por este motivo, foram realizadas medidas de tensão superficial do meio de cultura.

Figura 26 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7: NaNO₃ e 0,1% RL.

Os resultados obtidos de tensão superficial (TS) e de concentração micelar diluída (CMD) são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - TS, CMD⁻¹ e CMD⁻² do meio de cultura MS7 e dieldrin: NaNO₃ e 0,1% de ramnolípido.

Tempo (dias)	TS (mN m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN m ⁻¹)
0	27,18 ± 0,01	26,61 ± 0,01	31,70 ± 0,48
7	27,73 ± 0,00	30,10 ± 0,05	43,36 ± 0,09
14	27,45 ± 0,01	27,96 ± 0,01	38,96 ± 0,06
21	27,22 ± 0,02	30,22 ± 0,03	43,88 ± 0,10
28	27,45 ± 0,02	29,16 ± 0,09	45,50 ± 0,12

Como pode ser observado na Tabela 12, a CMD⁻² apresenta uma variação ao comparar o valor inicial. Pode-se assumir que houve consumo mínimo do ramnolípido pela bactéria principalmente nos primeiros 7 dias de incubação, quando a bactéria apresentou maior crescimento. Entretanto, observa-se que a população se manteve viável após 28 dias de incubação, e não foi observado um aumento significativo da tensão superficial. Comparando-se o meio MS7 com meio MS6, observa-se que as células sobreviveram sem a adição de ramnolípido, o que

sugere que estas não tem necessidade de utilizar o surfatante para a sua manutenção. Esta observação reforça a ideia que o aumento da biodegradação de dieldrin em meio mínimo (MS6 e MS7) se deveu à adição de ramnolípídeo, que promoveu a emulsificação do pesticida, favorecendo o contato, e consequente metabolização pela célula.

Ao alterar a fonte de nitrogênio do meio mínimo observou-se que a biodegradação ocorreu mais rapidamente. A biodegradação de dieldrin no meio MS8 (Figura 27) ocorreu durante os 14 dias de incubação, havendo maior taxa de consumo do pesticida no sétimo dia. Ao final do experimento, o consumo total de dieldrin foi de 31,2%, superior ao obtido no meio MS6 (aproximadamente 17% em 28 dias de incubação), o que sugere que em meio mínimo, o nitrato de amônio promove maior taxa de biodegradação. A população celular se manteve constante, apresentando um pequeno aumento entre 7 e 14 dias.

Figura 27 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 .

Os resultados do teste em meio MS9 estão apresentados na Figura 28, a seguir. Observa-se que a biodegradação do dieldrin ocorreu nos primeiros 7 dias de ensaio, quando os microrganismos estavam na fase logarítmica de crescimento. Ao

final do experimento, a degradação atingiu 36,8%. Assim como em meio MS7, a redução da concentração de ramnolípídeo só é observada ao comparar os valores de CMD^{-2} , que em 14 dias foi de $41,42 \pm 0,15 \text{ mN m}^{-1}$. Comparando-se o meio MS8 e MS9, a adição de ramnolípídeo foi pouco favorável na biodegradação de dieldrin, o que sugere que a fonte de nitrogênio utilizada influencia na disponibilidade do pesticida pelo ramnolípídeo.

Figura 28 - Biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% RL.

Os resultados obtidos ao testar a biodegradação de dieldrin com os meios de Robert *et al.* (1989) modificado estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 –. Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de dieldrin nos diferentes meios de cultura testados.

Meio	Log UFC mL ⁻¹	Taxa de biodegradação (%)
MS1	13,3	49,2
MS2	16,0	40
MS3	13,8	49,2
MS4	17,0	26,8
MS5	13,3	27,6
MS6	9,0	10
MS7	11,3	33,2
MS8	8,2	31,2
MS9	9,2	36,8

Foram detectados elevado crescimento celular nos meios MS4 e MS5, com destaque para o meio MS4, no entanto, esta condição não se manteve até o final do experimento, quando observado morte celular conforme discutido anteriormente.

Obteve-se taxa de biodegradação de 49,2% para ambos os meios MS1 e MS3. O número de células viáveis foi maior no meio MS3, o que pode ter ocasionado à mesma taxa de biodegradação para ambos os meios.

Nos meios sem glicose, observa-se que naqueles com adição de RL foram detectadas maiores taxas de biodegradação e maior número de células viáveis, inclusive, taxas comparáveis com os meios adicionados de glicose.

O percentual de biodegradação e o número de células viáveis variaram de acordo com a fonte de nitrogênio e a presença ou não de glicose. Na presença de glicose, o nitrato de sódio favoreceu a biodegradação de dieldrin por *P. aeruginosa* L2-1, enquanto que o nitrato de amônio é mais indicado na ausência de glicose e sem RL, já na presença de RL e na ausência de glicose, ambas as fontes de nitrogênio são adequadas.

Embora o tempo de incubação tenha sido superior nos meios sem a adição de glicose, pode-se afirmar que a glicose foi necessária para que ocorresse um crescimento celular mais intenso e implicando em taxas de biodegradação mais elevadas em curto prazo.

5.2.1.2 Biodegradação de DDD em diferentes meios de cultura

Constatou-se nos ensaios em meio MS1 (Figura 29) a degradação de 24% do pesticida. A degradação ocorreu principalmente nos primeiros dias de incubação,

sendo que a *Pseudomonas* L2-1 degradou 23% do DDD em três dias de experimento.

Apesar das eficiências de degradação terem sido significativamente diferentes, os resultados obtidos nos ensaios de dieldrin e DDD foram semelhantes. Assim como os ensaios com dieldrin, a degradação do DDD parece estar relacionada com o crescimento celular. O pH da amostra apresentou variação durante o ensaio, iniciando em 7, houve um decaimento após 24 horas de cultivo (6,5) e posteriormente a amostra teve seu pH elevado, chegando a 8,9. A elevação do pH coincidiu com o consumo total da glicose do meio e com a pausa na biodegradação do DDD.

Figura 29 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1: 1% de glicose e NaNO_3 .

Em meio MS2 (Figura 30) foram realizados dois pulsos de glicose, um no tempo 2 dias, quando a concentração de glicose no meio havia acabado, e outro pulso no tempo 3 dias, quando o segundo pulso de glicose havia sido totalmente consumido. Foi necessário reajustar o pH da amostra no terceiro dia de incubação, pois este era inferior a 4, o que poderia influenciar no crescimento celular.

A biodegradação de DDD em meio MS2 (Figura 30) ocorreu de forma semelhante à em meio MS1 até o primeiro pulso de glicose. Após o segundo pulso de glicose, a biodegradação continuou de forma lenta, no entanto não estagnou como constatado em 72 horas no meio MS1. Isso implica que a disponibilidade da glicose influenciou na biodegradação do DDD, resultando em 26% de biodegradação.

Figura 30 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS2: 1%+1%+1% de glicose e NaNO_3 .

Em meio MS3 (Figura 31), a degradação do DDD ocorreu principalmente após 24 horas de incubação, durante a fase logarítmica de crescimento. Em 72 horas de experimento a glicose foi totalmente consumida e o pH atingiu valor de 7. Após o final do experimento, o consumo de DDD foi de 50%. A redução da concentração de glicose do meio favoreceu a biodegradação de DDD.

Figura 31 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3: 0,5% de glicose e NaNO_3 .

Em meio MS4 (Figura 32), a biodegradação ocorreu principalmente na fase logarítmica de crescimento celular, que aconteceu durante as primeiras 24 horas de incubação. Ao final do experimento, 29,2% do DDD total da amostra havia sido consumido. Em 72 horas de incubação, a glicose havia sido totalmente consumida, e o pH da amostra era 7. Comparando-se a alteração da fonte de nitrogênio (meio MS1 e MS4), observa-se pequeno aumento da degradação na presença do nitrato de amônio, que pode ser atribuído devido ao aumento da população celular em meio MS4.

Figura 32 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4: 1% de glicose e NH_4NO_3 .

Em meio MS5 (Figura 33), assim como nos outros meios testados, a biodegradação ocorreu principalmente na fase logarítmica de crescimento celular. O pH apresentou comportamento semelhante ao constatado no meio MS4, provavelmente devido à fonte de nitrogênio utilizada. O consumo da glicose foi total em 24 horas de incubação. Ao final do experimento 29,6% do DDD total da amostra havia sido consumido. A redução da concentração (MS4 e MS5) de glicose não afetou a biodegradação de DDD, diferente do observado para o dieltrin.

Figura 33 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 .

Nos ensaios de biodegradação de DDD com meio MS6 (Figura 34) observa-se que a degradação ocorreu principalmente entre 7 e 14 dias de incubação, quando foram degradados 22,4% do DDD total. Durante os 28 dias de incubação, a *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 degradou 23,8% do pesticida presente na amostra. Não foi observada uma relação direta do crescimento celular com a degradação do pesticida, ao contrário do que foi observado nos demais meios. O pH da amostra se manteve inalterado durante todo o experimento.

Figura 34 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6: NaNO₃.

Ao utilizar o meio MS7 (Figura 35), observou-se que a biodegradação iniciou no sétimo dia de incubação. A biodegradação ocorreu principalmente durante os primeiros 14 dias de experimento atingindo 29,8%. O pH da amostra não sofreu alterações ao longo do experimento. A adição de ramnolípídeo favoreceu a biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, sendo que em meio MS6, o rendimento de biodegradação foi de 24% e, na presença de ramnolípídeo (meio MS7), o rendimento foi de 32%.

Os dados da Tabela 14 sugerem, assim como para o dieldrin, que o ramnolípídeo não foi utilizado diretamente como fonte de carbono, uma vez que os valores de TS não foram alterados, observando pequenas variações apenas em CMD.

Figura 35 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7: NaNO₃ e 0,1% RL.

Tabela 14 - TS, CMD⁻¹ e CMD⁻² do meio de cultura MS7 e DDD: NaNO₃ e 0,1% de ramnolipídeo.

Tempo (dias)	TS (mN m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN m ⁻¹)
0	27,18 ± 0,01	26,61 ± 0,01	31,70 ± 0,48
7	27,41 ± 0,01	29,29 ± 0,11	43,32 ± 0,37
14	27,38 ± 0,02	28,40 ± 0,05	34,82 ± 0,20
21	27,22 ± 0,02	29,42 ± 0,03	42,78 ± 0,10
28	27,27 ± 0,02	29,86 ± 0,13	39,13 ± 0,54

Em meio MS8 (Figura 36), foi evidenciada redução da quantidade de DDD na amostra nos tempos 7 e 14 dias. Não ocorreu variação significativa no pH da amostra. O consumo total, no final do experimento foi de 24,7%, superior ao obtido para o meio MS6 (NaNO₃) em 14 dias que foi de 22,4%.

Figura 36 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 .

A biodegradação de DDD em meio MS9 (Figura 37) ocorreu mais rapidamente que em meio MS8 no tempo de 7 dias, promovendo a degradação de 33,7% do pesticida da amostra. Após o sétimo dia de incubação, a quantidade de DDD não sofreu alteração significativa, ou seja, a biodegradação ocorreu principalmente durante o crescimento celular (até sete dias de incubação). A CMD^{-2} ($46 \text{ mN m}^{-1} \pm 0,79$) do meio apresentou uma pequena variação, ao comparar com o valor da mesma variável inicialmente no experimento, desta forma, como sugerido anteriormente, o ramnolípídeo não foi utilizado como fonte de carbono. O pH da amostra não sofreu variação durante o intervalo de experimento.

Figura 37 - Biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% RL.

A adição de ramnolípido em meio mínimo contendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio favoreceu a biodegradação de DDD, assim como o observado em meio mínimo contendo nitrato de sódio (MS6 e MS7).

Os resultados obtidos ao testar a biodegradação de DDD com os meios de Robert *et al.* (1989) modificado estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de DDD nos diferentes meios de cultura testados.

Meio	Log UFC max (UFC mL ⁻¹)	biodegradação (%)
MS1	15,1	23,1
MS2	16,2	24,8
MS3	15,9	49,4
MS4	14,6	29,8
MS5	15,2	29,1
MS6	9,9	23,8
MS7	11,3	29,8
MS8	8,3	24,7
MS9	8,8	33,7

Ao contrário do que foi observado para os testes com dieldrin, nos testes com DDD não é evidenciado nenhuma diferença brusca nas taxas de biodegradação

obtidas, com exceção para o meio MS3, onde foi detectada a maior taxa de biodegradação. Nos demais meios de cultura foram observadas taxas de biodegradação que variam de 23-33%. As menores taxas de biodegradação foram observadas nos meios MS1, MS2, MS6 e MS8.

Da mesma forma que foi observada com o dieltrin, pode-se afirmar que a glicose foi necessária para que ocorresse um crescimento celular mais intenso, proporcionando maior população e implicando em taxas de biodegradação mais elevadas em curto prazo.

5.2.1.3 Biodegradação do PCP em diferentes meios de cultura

Em meio MS1 (Figura 38), a biodegradação de PCP ocorreu nas primeiras 48 horas de ensaio, quando houve a redução de aproximadamente 9,2% do PCP da amostra. É possível observar que houve uma pequena redução de PCP da amostra quando a bactéria estava na fase exponencial de crescimento, no entanto, após este decréscimo na concentração de PCP, houve um declínio no número de células viáveis da amostra, indicando que o PCP metabolizado pela bactéria ou algum produto gerado da biodegradação pode ter sido prejudicial às células. Após o declínio no número de células viáveis da amostra, não houve mais degradação do PCP. A acidificação do meio pode ter ocorrido devido à formação de metabólitos ácidos derivado do metabolismo celular dificultando a sobrevivência das células.

Como a glicose do meio MS1 não foi totalmente consumida, não foram realizados testes com PCP em meio MS2.

Figura 38 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1: NaNO₃ e 1% de glicose.

Em meio MS3 (Figura 39), o crescimento celular foi linear (indicando fase exponencial), e a biodegradação do pesticida foi crescente, conforme o aumento da população microbiana. Observou-se pequena variação do pH da amostra nos tempos de amostragem. A glicose do meio foi totalmente consumida após 72 horas de incubação. Ao final do experimento, a *P. aeruginosa* L2-1 consumiu aproximadamente 50% do PCP da amostra.

Figura 39 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3: NaNO₃ e 0,5% de glicose.

A redução da concentração da glicose favoreceu a biodegradação de PCP por *P. aeruginosa* L2-1.

Em meio MS4 (Figura 40), a biodegradação do PCP ocorreu nas primeiras 24 horas de ensaio. Não houve crescimento celular, e no terceiro dia de incubação já não havia mais células viáveis. O pH foi reduzido para 3 no primeiro dia de ensaio, e se manteve até o final do experimento. A glicose do meio não foi totalmente consumida e 15,5% de PCP foram degradados no final do experimento.

A alteração da fonte de nitrogênio não afetou significativamente a biodegradação de PCP por *P. aeruginosa* L2-1, ao comparar o gráfico referente ao meio MS1 com ao do meio MS4.

Figura 40 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4: NH_4NO_3 e 1% de glicose.

Em meio MS5 (Figura 41), o crescimento celular e o pH apresentaram desempenho semelhante ao em meio MS4. No entanto, o percentual referente ao consumo de glicose foi superior em meio MS5, assim como a taxa de biodegradação. Ao final do experimento aproximadamente 27% do PCP havia sido metabolizado.

Figura 41 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5: 0,5% de glicose e NH_4NO_3 .

Durante os ensaios de meio MS6 (Figura 42) com o PCP, houve uma pequena redução na concentração de PCP durante os primeiros 14 dias de ensaio, que coincidiu com o aumento da população microbiana. Após 21 dias não foi observado redução da quantidade de PCP do meio. No final do experimento, 18,8% do pesticida da amostra havia sido degradado.

Figura 42 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6: NaNO₃.

Em meio MS7 (Figura 43), a biodegradação ocorreu principalmente entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia de incubação. O pH da amostra se manteve inalterado durante o experimento. Após 28 dias de incubação, foram metabolizados 32% do PCP total presente na amostra.

Figura 43 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7: NaNO₃ e 0,1% de RL.

Em meio MS8 (Figura 44), não houve biodegradação do pesticida. O número de células viáveis se manteve constante durante os dias de incubação, o pH do meio se manteve inalterado.

O meio MS9 (Figura 45) favoreceu a biodegradação de PCP. O consumo de PCP ocorreu ao longo dos 14 dias de experimento. A população microbiana aumentou durante os primeiros 7 dias de cultivo, atingindo um patamar. Não houve alteração no valor do pH da amostra. No final do experimento, aproximadamente 43% do PCP da amostra foi degradado.

Figura 44 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8: NH_4NO_3 .

Figura 45 - Biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9: NH_4NO_3 e 0,1% de RL.

Os resultados obtidos ao testar a biodegradação de PCP com os meios de Robert *et al.* (1989) modificado estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Comparação entre o crescimento celular e a biodegradação de PCP nos diferentes meios de cultura testados.

Meio	UFC max (UFC mL ⁻¹)	Taxa de biodegradação (%)
MS1	9,0	9,2
MS2	--	--
MS3	12,9	50,2
MS4	7,1	15,5
MS5	7,1	27,3
MS6	8,0	18,8
MS7	8,6	32,0
MS8	7,1	0
MS9	8,9	42,8

O número de células viáveis máximo detectado em cada meio foi relativamente inferior aos obtidos na presença de DDD e dieldrin, o que pode indicar toxicidade do PCP para a bactéria. No entanto, o número de células viáveis máximo foi detectado no meio onde houve maior taxa de biodegradação. Entre os meios com glicose, no meio MS3 (meio com 0,5% de glicose e NaNO₃) foram observadas melhores condições para a degradação do PCP pela bactéria.

Na Tabela 16 também fica bastante evidente que a redução da concentração de glicose nos meios favoreceu a biodegradação de PCP. Observa-se que a taxa de biodegradação quase dobra ao reduzir a concentração de glicose pela metade (MS5) no meio MS4. Em meio MS1, ao reduzir pela metade a concentração de glicose (MS3), a taxa de biodegradação quintuplica.

De uma forma geral, a adição de RL nos meios mínimos favoreceu a biodegradação. Dentre os três pesticidas testados, este foi o que mais ficou evidente a influencia do RL na biodegradação. Em meio mínimo, a adição de ramnolípídeo quase dobra a biodegradação quando se utiliza o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, e ao utilizar o nitrato de amônio, a biodegradação que não havia ocorrido, chega a ser superior que 40%.

5.2.1.4 Discussão geral sobre a biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1

A comparação da biodegradação levando em conta condições de incubação e as fontes de nitrogênio e carbono utilizadas no meio de cultura, pode ser dificultada devido ao fato que cada espécie possui uma via metabólica distinta, e mesmo para microrganismos da mesma espécie pode haver variações. No caso da *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, de uma forma geral, é possível afirmar que a biodegradação dos pesticidas ocorreu principalmente na fase exponencial de crescimento celular, sugerindo relação direta entre o crescimento celular e a biodegradação do pesticida. A redução da concentração de glicose (de 1% para 0,5%) favoreceu a biodegradação dos pesticidas organoclorados. Premalatha e Rajakumar (1994) observaram que a concentração de 0,5% de glicose era mais favorável a degradação do PCP (200 mg L^{-1}) por *Pseudomonas* sp. No entanto, neste mesmo estudo afirma-se que em concentrações superiores à 0,5% de glicose, o crescimento celular era reprimido, fato que não foi observado com a *Pseudomonas aeruginosa* L2-1.

Nos meios com 1% de glicose (MS1 e MS4), a alteração da fonte de nitrogênio influenciou a biodegradação dos pesticidas organoclorados, o nitrato de amônio favoreceu apenas a biodegradação do PCP, enquanto que os meios com nitrato de sódio apresentaram melhores resultados de biodegradação de dieldrin. A alteração da fonte de nitrogênio não teve grande influência da biodegradação de DDD.

Premalatha e Rajakumar (1994) também relataram a influência da fonte de nitrogênio na biodegradação de PCP por *Pseudomonas* sp. De acordo com este estudo, sais de amônio suportaram, tanto, o crescimento como a degradação do PCP, enquanto sais de nitrato não favoreceram o crescimento bacteriano.

Elevadas concentrações de massa celular e alginato, diminuem o oxigênio dissolvido no meio de cultura. Moore et al. (2006) afirmaram que *Pseudomonas aeruginosa* produz alginato principalmente quando cultivadas em meios com elevada concentração de carbono e deficiência de um elemento essencial. Isto leva a crer, que a possível produção de alginato (observada pelo aumento da viscosidade do meio de cultura quando da presença de nitrato de sódio), influenciou a oxigenação do meio, o quê favoreceria a respiração anaeróbia, utilizando o nitrato como aceptor final de elétrons. De acordo com a revisão bibliográfica, na maioria dos casos citados, a biodegradação dos pesticidas organoclorados ocorre aerobiamente. Desta forma, a alteração do aceptor final de elétrons, devido a

elevada viscosidade do meio, pode ter reduzido a taxas de biodegradação nos meios com maior concentração de glicose uma vez que esta é relacionadas ao crescimento celular.

A relação entre a concentração de carbono e de nitrogênio também possui influência sobre a biodegradação, embora poucos estudos encontrados tenham utilizado este argumento para discorrer sobre a biodegradação de organoclorados, outros trabalhos envolvendo o tratamento de resíduos orgânicos pelo método de compostagem, afirmam que a relação C:N possui influência na biodegradação (EILAND et al., 2001; KARNCHANAWONG; SAPUDOM, 2011). Lamar e White (2001) observaram que o aumento da relação C:N aumentou a degradação de pentaclorofenol por *Phanerochaete chrysosporium*. Na Tabela 17 encontram-se os valores aproximados de C:N dos meios MS1:MS5 e a respectiva taxa de biodegradação obtida para cada pesticida.

Tabela 17 - Relação C:N dos meios testados e a taxa de biodegradação obtida após 3 dias de incubação.

Meio	C:N	Taxas de biodegradação (%)		
		Dieldrin	DDD	PCP
MS1	12:1	49,2	23,1	9,2
MS2	36:1	40	24,8	-
MS3	6:1	49,2	49,4	50,2
MS4	6:1	26,8	29,8	15,5
MS5	3:1	27,6	29,1	27,3

De acordo com a Tabela 17, observa-se que não há uma relação óbvia entre a C:N e as taxas de biodegradação. No entanto, ao levar em consideração a fonte de nitrogênio utilizada, observa-se que para as mesmas fontes de nitrogênio (MS1-MS3 e MS4-MS5), C:N menores favoreceram a biodegradação. Desta forma, é seguro afirmar que para as mesmas fontes de nitrogênio testadas, a relação C:N influenciou as taxas de biodegradação. Isto implica que além da C:N, a fonte de nitrogênio também influenciou nas taxas de biodegradação.

Nos meios mínimos testados (MS6-MS9), a adição de ramnolipídeo favoreceu a biodegradação dos três pesticidas, provavelmente pela maior disponibilização dos pesticidas insolúveis em água para as células. Houve pequena variação na concentração de ramnolipídeo ao comparar os valores de CMD⁻² inicial com o final, porém, a variação é pequena, e descartando-se a possibilidade das taxas de biodegradação terem sido consideravelmente superiores devido ao consumo do

ramnolipídeo como fonte de carbono. KARANTH, DEO e VEENANADIG (2005) afirmaram que o biossurfatante produzido pelo isolado *Pseudomonas* Ptm foi capaz de solubilizar HCH, ciclodienos e DDT em diferentes concentrações, o quê sugere que a adição do ramnolipídeo aos meios de cultura testados pode também ter favorecido a solubilização dos pesticidas DDD, PCP e dieldrin em diferentes concentrações, o quê influi diretamente na taxa de biodegradação de cada pesticida.

A Figura 46 abaixo ilustra os rendimentos obtidos para a degradação dos pesticidas nos diferentes meios testados.

Figura 46 - Porcentual de biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1; MS1-MS5: 3 dias de incubação, MS6-MS9: 14 dias de incubação.

De uma forma geral, na presença de glicose, os resultados de biodegradação obtidos em meio de cultura MS3 foram superiores para todos os pesticidas organoclorados testados. Em meio mínimo, os resultados de biodegradação obtidos em meio MS9 foram relativamente superiores aos obtidos em meio MS7, mas pode-se afirmar que ambos os meios foram favoráveis à biodegradação, o que ressalta a importância do ramnolipídeo nos testes de biodegradação realizados.

Considerando os ensaios realizados em meio mínimo (MS6-MS9: pesticidas como fonte de carbono), observou-se que a *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 apresentou capacidade de degradar os pesticidas nestas condições. Comparando-se com os meios adicionados de glicose (MS1-MS5), principalmente o MS3, que apresentou maior porcentual de degradação, pode-se afirmar que a presença de uma fonte de carbono prontamente assimilável acelerou a degradação.

Em comparação com outros estudos realizados, a Quadro 1 abaixo relaciona o meio de cultura utilizado (fonte de carbono e nitrogênio), condição de incubação (rotação e pH), microrganismo e a taxa de biodegradação.

Quadro 1 – Resultados obtidos em estudos semelhantes em condições aeróbias.

	Concentração (mg L ⁻¹)	Microorganismo	pH e rotação (RPM)	Fonte de C	Fonte de N	Taxa de biodegradação (%) e tempo de incubação	Referência
Dieldrin	5	<i>Pseudonocardia</i> sp	7 310	Ac. Pirúvico	-	73,3% (10 dias)	Sakakibara et al. (2011)
	10	<i>P. fluorescens</i>	7 n.i.	Glicose; Peptona	Peptona	77,8% (120 h)	Bandala et al. (2006)
	9,5	<i>Phlebia</i> sp.	4,5 -	Glicose	Amônio	50% (28 dias)	Xiao et al. (2011)
	33,3	<i>Trichoderma</i> sp.	8 150	Extrato de malte; Peptona	Peptona	100% (14 dias)	Ortega et al. (2010)
DDD	150	<i>P. aeruginosa</i>	6,3 100	-	NaNO ₃	100% (8 dias)	Wolski et al (2006)
	200	<i>P. aeruginosa</i>	7,6 300	Glicose	NH ₄ NO ₃	100% (5 dias)	Premalatha; Rajakumar (1994)
	80	<i>P. veronii</i>	7 160	-	NH ₄ NO ₃	30% (72 h)	Nam et al. (2003)
	250	<i>S. chlorophenolica</i>	6,9 120	-	NH ₄ NO ₃	100% (90 h)	Yang; Lee; Wang (2006)
PCP							

Não foram encontrados trabalhos que utilizaram o ramnolípideo para a degradação dos pesticidas organoclorados em questão.

Os estudos envolvendo biodegradação dos pesticidas dieldrin, DDD e PCP apresentam resultados variados em relação a taxa de biodegradação. Bandala et al. (2006) relataram que aproximadamente 78% de 10 mg L⁻¹ do dieldrin foi degradado por *P. fluorescens*.

O único estudo relatando a biodegradação de DDD como fonte inicial, foi reportado por Ortega et al. (2010), onde foi observada a mineralização do pesticida pelo fungo *Trichoderma* sp. Curiosamente, melhores taxas de biodegradação foram encontradas para estudos envolvendo o PCP, onde foram utilizadas elevadas concentrações iniciais do pesticida (vide Quadro 1).

5.2.1.5 Metabólitos envolvidos na biodegradação de dieldrin, DDD e PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1

Ao analisar os extratos obtidos para os diferentes pesticidas testados em CG/MS, observou-se a formação de metabólitos com o mesmo tempo de retenção em meios de cultura distintos. Embora não tenha sido possível elucidar as vias de degradação dos pesticidas organoclorados por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, pode-se afirmar que o mecanismo de degradação gera os mesmos subprodutos para os três pesticidas. Além disso, alguns metabólitos formados podem não ter sido recuperados no solvente orgânico escolhido para realizar a extração, assim como mencionado por Matsumoto et al. (2009).

Nos meios com glicose (MS1-MS5), constatou-se a formação de ramnolípideo no meio, o pico referente ao ramnolípideo apresentou intensidade variável em função do meio de cultura utilizado. A formação de ramnolípideo nos meios com glicose pode ser apontado como um dos fatores pelo qual o nitrato de amônio não tenha sido favorável a biodegradação, pois nestes meios (MS4 e MS5) observou-se pequena formação de ramnolípideo.

Além do ramnolípideo, nos meios com glicose, observou-se a formação de três picos em 23 minutos, que não foram identificados, no entanto, pela similaridade dos espectros de massas sugeridos pela biblioteca, é possível que sejam ácidos graxos saturados. Em alguns extratos analisados, observou-se em 38,5 minutos a formação de dois picos, ambos identificados como o ácido carboxílico fenazina, que é

o pigmento piocianina oxidado, produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Picos com baixa intensidade foram detectados no início do cromatograma (5-10 minutos), porém sua elucidação não foi possível.

O cromatograma do extrato obtido após a incubação de três dias da *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3 é mostrado na Figura 47. É possível observar o pico referente ao ramnolipídeo (RL), o padrão interno (PCP), os picos em 23,5 minutos e o ácido carboxílico fenazina (38,5 minutos – piocianina-COOH), além do pesticida utilizado no teste de biodegradação. O ácido carboxílico fenazina foi detectado em todos os ensaios de dieldrin com glicose, e em pequenas intensidades nos meios MS7 e MS9 (meios mínimos adicionados de ramnolipídeo). O espectro de massas do ácido carboxílico fenazina (piocianina-COOH) encontra-se na Figura 48.

Figura 47 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose.

Figura 48 - Espectro de massas identificando o ácido carboxílico fenazina (pico em 38.5 minutos).

Durante os ensaios com DDD observou-se a formação dos mesmos picos detectados nos ensaios com dieldrin (Figura 49).

Figura 49 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose.

Embora o meio MS3 tenha sido o que mais favoreceu a biodegradação de PCP, não foi possível detectar nenhum metabólito que tenha apresentado pico com área relevante, no entanto foi possível observar a formação dos picos com tempo de retenção em 23 minutos, os quais não foram observados no meio MS1, onde não houve biodegradação, e também foram observados os picos com baixa intensidade no início do cromatograma (5-10 minutos). Nos meios de cultura MS4 e MS5, onde foi utilizado o nitrato de amônio como fonte de carbono, não foram observados os três picos em 23 minutos com intensidade relevante, no entanto observou-se a formação de um pico no início do cromatograma, que não foi elucidado. Abaixo, seguem os cromatogramas dos ensaios com PCP em meio MS3 (Figura 50) e MS4 (Figura 51).

Figura 50 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS3 após três dias de incubação: NaNO_3 e 0,5% de glicose.

Figura 51 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose.

Durante os ensaios em meio mínimo, observou-se a formação de metabólitos apenas nos meios adicionados de ramnolípido, ou seja, nos meios MS7 e MS9. Nos meios MS6 e MS8, como não foram detectados metabólitos, porém houve pequena redução na concentração dos pesticidas testados, é plausível sugerir que tenha ocorrido a mineralização do pesticida, ou que metabólitos formados não tenham sido extraídos para a fase orgânica, e por este motivo não foram detectados.

Nos meios MS7 e MS9 foram detectados os mesmos metabólitos para cada pesticida testado. A única diferença foi à intensidade dos picos, sendo maiores em meio MS9, onde o rendimento de biodegradação foi superior para os três pesticidas.

Os picos em 23 minutos foram detectados nos extratos dos três pesticidas testados, para os meios MS7 e MS9.

Um pico em 41 minutos também foi detectado, porém não foi possível elucidá-lo. Este metabólito foi detectado nos testes com os três pesticidas, indicando que possivelmente a via de degradação dos pesticidas organoclorados por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 é o mesmo, assim como sugerido por Moore et al. (2005).

Abaixo seguem os cromatogramas dos testes de dieldrin, DDD e PCP em meio MS9, onde é possível observar os picos mencionados.

Figura 52 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL.

Figura 53 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL.

Figura 54 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS9 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,1% de RL.

Os demais cromatogramas e espectros de massas estão disponíveis nos apêndices II e III.

5.3 Principais resultados

- Bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentaram maior tolerância aos pesticidas organoclorados, principalmente os isolados *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 e *Pseudomonas aeruginosa* B1-3;
- Bactérias marinhas *Arthrobacter* sp. 440, *Arthrobacter* sp. 123, *Micrococcus* sp. 161, *Bacillus* sp. 210 apresentaram resistência ao pesticida dieldrin;
- A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 foi selecionada para ensaios de biodegradação por apresentar maior tolerância aos três pesticidas organoclorados;
- O meio de cultura MS3 (NaNO_3 e 0,5% de glicose) foi o que apresentou melhor condições para a biodegradação do dieldrin, DDD e PCP, sendo que o rendimento de biodegradação para os três pesticidas após 72 horas de ensaio foi de aproximadamente 50%;
- A produção de RL nos meios com adição de glicose pode ser um dos motivos pelas taxas mais elevadas de biodegradação;
- O meio de cultura MS9 (NH_4NO_3 e 0,1% de RL) foi o que apresentou melhores condições para a biodegradação do dieldrin, DDD e PCP na ausência de glicose, sendo observado após 14 dias de incubação, taxas de biodegradação de 36,8% para o dieldrin, 33,65% para o DDD e 42,8% para o PCP;
- A alteração da fonte de nitrogênio afetou a biodegradação de dieldrin na presença de glicose, tendo uma redução de aproximadamente 50% na biodegradação de dieldrin nos meios MS4 e MS5 (em comparação aos meios MS1 e MS3) ao alterar a fonte de nitrogênio NaNO_3 para NH_4NO_3 ;
- A redução da concentração de glicose não prejudicou a biodegradação dos pesticidas organoclorados por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, em alguns casos, observou-se um aumento no rendimento de biodegradação ao reduzir a concentração da fonte preferencial de carbono (DDD e PCP em meio MS3; PCP em meio MS5);
- A presença de RL nos meios mínimos favoreceu a biodegradação de todos os pesticidas, independente da fonte de nitrogênio utilizada.

6 Conclusões

- A bactéria selecionada *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 possui potencial para biodegradar os pesticidas organoclorados dieldrin, DDD e PCP;
- A presença de glicose não foi essencial para a biodegradação ocorrer, no entanto, a sua presença aumentou a velocidade em que a biodegradação ocorreu, funcionando assim como um catalisador das reações;
- O tipo de fonte de nitrogênio influenciou diretamente na biodegradação dos pesticidas;
- A presença de ramnolípídeo favoreceu a biodegradação dos pesticidas organoclorados pela *P. aeruginosa* L2-1.

7 Sugestões para trabalhos futuros

- Investigar o potencial de biodegradação da *Pseudomonas aeruginosa* B1-3 frente aos pesticidas organoclorados dieldrin, DDD e PCP;
- Investigar o potencial de degradação das bactérias marinhas: *Arthrobacter* sp. 440, *Arthrobacter* sp. 123, *Bacillus* sp. 210 e *Micrococcus* sp. 161 frente ao dieldrin;
- Otimizar os rendimentos de biodegradação da *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, controlando as variáveis: tempo de incubação, tamanho do inóculo, pH do meio, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, presença de ramnolipídeo, e alterando as condições de incubação (agitação e temperatura);
- Avaliar diferentes sistemas de extração para identificar os possíveis metabólitos produzidos;
- Investigar e caracterizar os metabólitos encontrados durante os experimentos.

Referências

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for pentachlorophenol**. Georgia: ASTDR, 2001. 316p.
- AHRENS, R.; WEBER, C. DDT un die stockholmer konvention – staaten am rande der legalität. **Pestizid Aktions-Netzwerk (PAN)**, Hamburg, 2009.
- AISLABIE, J.M.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research**, v. 33, p. 925-942, 1995.
- AISLABIE, J. M.; RICHARDS, N. K.; BOUL, H. L. Microbial degradation of DDT and its residues – a review. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 40, p. 269-282, 1997.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2. ed. New York: John Wiley, 1977. 467 p.
- ALMEIDA, F. V.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W.F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.
- ARISOY, M.; KOLANKAYA, N. Biodegradation of heptachlor by *Phanerochaete chrysosporium* ME 446: the toxic effects of heptachlor and its metabolites on mice. **Turkish Journal of Biology**, v. 22, p. 427-434, 1998.
- ATLAS, R. M. **Microbiology: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: MacMillan, 1988. 987 p.
- AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M.; FONSECA, M. F.; BRITTO, J. L.; BASTOS, W. R.; AZEVEDO E SILVA, C. E.; CAVALCANTI, G.; MEIRE, R. O.; SARCINELLI, P. N.; CLAUDIO, L.; MARKOWITZ, S.; MALM, O. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. **Chemosphere**, v. 73, n. 1, p. 246-251, 2008.
- AZEVEDO E SILVA, C. E.; AZEREDO A.; BRITTO, J. L.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Polychlorinated biphenyls and DDT in swordfish (*Xiphias gladius*) and blue shark (*Prionace glauca*) from Brazilian coast. **Chemosphere**, v. 67, p. 48–53, 2007.
- BANDALA, E. R.; ANDRES-OCTAVIANO, J.; PASTRANA, P.; TORRES, L. G. Removal of aldrin, dieldrin, heptachlor, and heptachlor epoxide using activated carbon and/or *Pseudomonas fluorescens* free cell cultures. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 41, n. 5, p. 553-569, 2007.
- BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; COSTA-PÉREZ, C.; PERALTA-CRUZ, J.; BARRERA-CORTÉS, J.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green coffee. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 239-244, 2007.

- BENIMELI, C. S.; FUENTES, M. S.; ABATE, C. M.; AMOROSO, M. J. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 233-239, 2007.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BOLLAG, J. M.; LIU, S. Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H. H. **Pesticides in the soil environment processes, impacts and modeling**. Madison, Wisconsin. Soil Science Society of America, 1990. p. 169-211.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução Resolução nº. 396 de 03 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/arquivos/res39608.pdf>. Acesso em: 19 out. 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. Resolução nº. 10 de 08 de março de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de março de 1985a. Seção 1, p. 4614.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº. 329 de 02 de setembro de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1985b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/329_85.htm>. Acesso em: 29 ago. 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Ato nº. 40 de 13 de Setembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 de Setembro de 2010. Seção 1.
- BUMPUS, J. A.; POWERS, R. H.; SUN, T. Biodegradation of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) by *Phanerochaete chrysosporium*. **Mycological Research**, v. 97, p. 95-98, 1993.
- CÁCERES O.; CASTELLAN, O. A. M.; MORAES, G.; PEREIRA, M. Resíduos de pesticidas clorados em água das cidades de São Carlos e Araraquara. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 12, p. 1622-1626, 1981.
- CHIU, T. C.; YEN, J. H.; HSIEH, J. N.; WANG, Y. S. Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. **Chemosphere**, v. 60, p. 1182-1189, 2005.
- CHYZANOWSKI, Ł.; OWSIANIAK, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; PIOTROWSKA-CYPLIKA, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; STANIEWSKI, J.; LISIECKI, P.; CIESIELCZYK, F.; JESIONOWSKI, T. HEIPIEPER, H. Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 605-611, 2011.
- CIUDAD, B. C.; MOYANO, A. S. Persistent pesticide residues in natural resources of the Aconcagua Valley. **Agricultura Técnica**, v. 48, p. 142-146, 1988.
- CONNELL, D. W.; MILLER, G. J.; MORTIMER, M. R.; SHAW, G. R.; ANDERSON, S. M. Persistent lipophilic contaminants and other chemical residues in the southern

hemisphere. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 47-82, 1999.

COSTA, SIDDHARTHA GEORGES VALADARES ALMEIDA DE OLIVEIRA. Biossurfatantes (ramnolípidios) a partir de substratos não-convencionais. 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2010.

CRAWFORD, R. L.; MOHN, W. W. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 12, p. 617-620, 1985.

CRAWFORD, R. L.; JUNG, C. M.; STRAP, J. L. The recent evolution of pentachlorophenol (PCP)-4-monooxygenase (PcpB) and associated pathways for bacterial degradation of PCP. **Biodegradation**, v. 18, p. 525-539, 2007.

DAI, M.; ROGERS, J. B.; WARNER, J. R.; COPLEY, S. D. A previously unrecognized step in pentachlorophenol degradation in *Sphingobium chlorophenolicum* is catalyzed by tetrachlorobenzoquinone reductase (PcpD). **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 302-310, 2003.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. **Report of the secretary's commission on pesticides and their relationship to environmental health**. Washington, US Department of Health, Education and Welfare, 1969. 43 p. (Relatório Técnico).

EILAND, F.; KLAMER, M.; LIND, A. M.; LETH, M.; BAATH, E. Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 272-280, 2001.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Carcinogenicity assessment of aldrin and dieldrin**. Washington: US Environmental Protection Agency, Carcinogen Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment, 1987. (Relatório Técnico).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Federal Insecticide, fungicide, and rodenticide act**. Washington: US Environmental Protection Agency, 2008. 109p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Toxicological review of pentachlorophenol**. Washington: US Environmental Protection Agency, 2010. 288 p.

FANG, H.; DON, B.; YAN, H.; TANG, F.; YU, Y. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, p. 281-289, 2010.

FOGHT, T.; APRIL, K.; BIGGAR, J.; AISLABIE, J. M. Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. **Bioremediation Journal**, v. 5, p. 225-246, 2001.

- FRIES, G. R.; MARROW, G. S.; GORDON, C. H. Metabolism of *o,p'*-DDT by rumen micro-organisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, p. 860-862, 1969.
- HANCOCK, R. E.; BRINKMAN, F. S. L. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 17-38, 2002.
- HAY, A. G.; FOGHT, D. D. Transformation of 1,1-dichloro-2,2-(4-chlorophenyl)ethane (DDD) by *Ralstonia eutropha* strain A5. **Microbiology Ecology**, v.31, p. 249-253, 2000.
- HONG ,H. C.; ZHOU, H. Y. ;LUAN, T. G.; LAN, C. Y. Residue of pentachlorophenol in freshwater sediments and human breast milk collected from the Pearl River Delta, China. **Environmental International**, v. 31, p. 643-649, 2004.
- JOHNSEN, R. E. DDT metabolism in microbial systems. **Pesticide Reviews**, v. 16, p. 1-28, 1976.
- JONATAN, T. **Introduction of environmental studies**. New York: Saunders College, 1989. 304p.
- KAMANAVALLI, C. P.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* species. **Current Microbiology**, v. 48, p. 10-13, 2003.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. **Microbial production of biosurfactants and their importance**. India: Central Food Technological Research Institute, 2005.18 p. (Relatório técnico).
- KARNCHANAWONG, S.; SAPUDOM, K. Effects of C/N ratio and moisture contents on performance of household organic waste composting using passive aeration bin. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL ENGINEERING AND APPLICATIONS, 2., 2011, Singapore. **Anais**. Singapore: IPCEE. 2011. p. 119-124.
- KONRADSEN, F.; VAN DER HOEK, W.; AMERRASINGHE, F. P.; MUTERO, C.; BOELEEE,E. Engineering and malaria control: learning from the past 100 years. **Acta Tropica**, v. 89, n. 2, p. 99-108, 2004.
- LAL; R.; SAXENA, D. M. Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 1, p. 95-127, 1982.
- LAMAR, R. T.; WHITE, R. B. Micoremediation – commercial status and recent developments. In: GLENN, V. S. M.; ONG, J. S.K.; LEESON, A. (Ed). **Bioremediation of energetics, phenolics and polycyclic aromatic hydrocarbons**. San Diego: Battelle Press, 2001. v. 3, p. 263-278.
- LANGLOIS, B. E.; COLLINS, J. A.; SIDES, K. G. Some factors affecting degradation of organochlorine pesticide by bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1671-1675, 1970.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA - Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.190p.

MADIGAN; MICHAEL, T.; PARKER. Microbiologia de Brock. Pearson Education do Brasil LTDA, 2010, 10 ed., 608 p.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 54, p 625-633, 2000.

MATOLCSY, G.; NÁDASY, M.; ANDRSIKA, V. **Pesticide Chemistry**. New York: Elsevier, 1988. p. 47-85.

MATSUMOTO, E.; KAWANAKA, Y. YUN, S. J., OYAIKU, H. Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 84, p. 205-216, 2009.

MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M. Dieldrin: degradation by soil microorganisms. **Science**, v. 156, p. 959-961, 1967.

MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M. Degradation of insecticides by a soil fungus, *Trichoderma viride*. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, p. 610-612, 1968.

MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M.; TAI, A. Breakdown of dieldrin in the soil by a micro-organism. **Nature**, v. 219, p. 965-967, 1968.

MATUO, Y. K.; LOPES, J. N. C.; MATUO, T. **Contaminação do leite humano por organoclorados DDT, BHC e Ciclodienos**. Jaboticabal: Editora da FUNEP, 1990. 99p.

MAULE, A.; PLYTE, S.; QUIRK, A. V. Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial populations. **Pesticidal Biochemical Physiology**, v. 27, p. 229-236, 1987.

McCARTHY, D. L.; CLAUDE, A. A.; COPLEY, S. D. *In vivo* levels of chlorinated hydroquinones in a pentachlorophenol-degrading bacterium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1883-1888, 1997.

MENEZES, C. A. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTI, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the North coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MENONE, M. L.; DE MORENO, J. E. A.; MORENO, V. J.; LANFRANCHI, A. L.; METCALFE L.; METCALFE, C.D. PCBs and organochlorines in tissues of silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a coastal lagoon in Argentina. **Environmental Contamination toxicology**, v. 38, n. 2, p. 202-208, 2000.

MERCK Index. 14. ed. New Jersey : Whitehouse Station, 2007. 2564p.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

MOORE, E.; TINDALL, B.; SANTOS, V. M. dos; PIEPER, D.; RAMOS, J.; PALLERONI, N. Nonmedical: *Pseudomonas*. **Prokaryotes, Part 3 Section 3.3**, v. 6, p. 646-703, 2006.

NADEAU, L. J.; MENN, F. M.; BREEN, A.; SAYLER, G. S. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. **Applied Environmental Microbiology**, v. 1, n. 60, p. 51-55, 1994.

NAM, I. H.; CHANG, Y. S.; HONG, H. B.; LEE, Y. E. A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 284-290, 2003.

ORSER, C. S.; LANGE, C. C.; XUN, L.; ZAHRT, T. C.; SCHNEIDER, B. J. Cloning, sequence analysis, and expression of the *Flavobacterium* pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 411-416, 1993.

ORTEGA, N. O.; NITSCHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**, v. 22, p. 43-50, 2010.

PATIL, K. C.; MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M. Degradation of endrin, aldrin, and DDT by soil microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 19, n.5, p. 879-881, 1970.

PATNAIK, P. **A comprehensive guide to hazardous properties of chemical substances**. New Jersey: John Wiley, 2003. p. 762-779.

PESCE, S. F.; WUNDERLIN, D. A. Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 255-260, 2004.

PORTO, A. L. M.; MELGAR, G. Z.; KASEMODEL, M. C.; NITSCHKE, M. Biodegradation of pesticides. In: STOYCHEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the modern world: pesticides use and management**. Rijeca: InTech, 2011. p. 1-32.

PREMALATHA, A.; RAJAKUMAR, G. S. Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 334-337, 1994.

RIGAS, F.; DRITSA, V.; MARCHANT, R.; PAPADOPOULOU, K.; AVRAMIDES, E. J.; HATZIANESTIS, I. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. **Environment International**, v. 31, p. 191-196, 2004.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology. Letters**, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.

ROBERTS, D. R. DDT and the global threat of re-emerging malaria. **Pesticide Safety News**, v. 2, n. 4, p. 4-5, 1999.

ROCHKIND-DUBINSKY, M. L.; SAYLER, G. S.; BLACKBURN, J. W. **Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds**. New York: Marcel Dekker, 1987. v. 18, p. 153-162. (Microbiology Series).

ROSE, R. L.; HODGSON, E.; ROE, R. M. Pesticides. In: MARQUARDT, H.; SCHAFER, S. G.; McCLELLAN, R. O.; WELSCH, F. **Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 663-697.

SAKAKIBARA, F.; TAKAGI, K.; KATAOKA, R.; KIYOTA, H.; SATO, Y.; OKADA, S. Isolation and identification of dieldrin-degrading *Pseudonocardia* sp. strain KSF27 using a soil-charcoal perfusion method with *trans*-diol as a structural analog of dieldrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 76-81, 2011.

SCHNELLE-KREIS, J.; SCHERB, H.; GEBEFÜGI, I.; KETTRUP, A.; WEIGELT, E. Pentachlorophenol in indoor environments. Correlations of PCP concentrations in air and settled dust from floors. **The Science of the Total Environment**, v. 256, p. 125-132, 2010.

SEIDLER, A.; HELLENBRAND, W.; ROBBA, B. P.; VIEREGGE, P.; NISCHAN, P.; JOERG, J.; OERTEL, W. H.; ULM, G.; SCHNEIDER, E. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: A case-control study in Germany. **Neurology**, v. 46, p. 1275-1284, 1996.

STANLAKE G. J.; FINN, R. K. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1421-1427, 1982.

STEVENSON, D. E.; WALBORG JR, E. F.; NORTH, D. W.; SIELKEN JR, R. L.; ROSS, C. E.; WRIGHT, A. S.; XU, Y.; KAMENDULIUS, L. M.; KLAUNIG, J. E. Monograph: Reassessment of human cancer risk of aldrin/dieldrin. **Toxicology Letters**, v. 109, p. 123-186, 1999.

SUASSUNA, K. **Contamination in Paulínia by aldrin, dieldrin, endrin and other toxic chemicals produced and disposed of by Shell Chemicals of Brazil**. São Paulo: Greenpeace Brazil, 2001. 17 p. (Relatório técnico).

SUGAWARA, E.; NESTOROVICH, E. M.; BEZRUKOV, S. M.; NIKAIDO, H. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 24, p. 16220-16229, 2006.

TURK, J. **Introduction to environmental studies**. New York: Saunders College, 1989. 329p.

VIEIRA, Elisa Diniz Reis. **Persistência ambiental e biológica do DDT: estudo de um caso em área tropical**. 1999. 81 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

- VILLA, R. D.; DORES, E. F. G. DE C.; CARBO, L.; CUNHA, M. L. F. C. Dissipation of DDT in a heavily contaminated soil in Mato Grosso, Brazil. **Chemosphere**, v. 64, n. 4, p. 549-554, 2006.
- WEDEMEYER, G. Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes*. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 569-574, 1967.
- WEDEMEYER, G. Partial hydrolysis of dieldrin by *Aerobacter aerogenes*. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 661-662.
- WOLSKI, E. A.; MURIALDO, S. E.; GONZALEZ, J. F. Effect of pH and inoculums size on pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas* sp. **Water SA**, v.32, n. 1, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Aldrin and dieldrin**. Geneva:International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 91 Geneva. WHO, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Aldrin and dieldrin in drinking-water**. Geneva: WHO, 2003. 14p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009**. Geneva: WHO, 2009. 81p.
- XIAO, P.; MORI, T. KAMEI, I.; KONDO, R. Metabolism of organochlorine pesticide heptachlor and its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to genus *Phlebia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, p. 140-146, 2011.
- YANG, C. F.; LEE, C. M.; WANG, C. C. Isolation and physiological characterization of the pentachlorophenol degrading bacterium *Sphingomonas chlorophenolica*. **Chemosphere**, v. 62, p. 709-714, 2006.
- YONG, R. N.; MULLIGAN, C. N. Natural attenuation of contaminants in soil. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. 307 p.

APENDICE I
(Curvas de calibração)

Figura 55 - Curva de calibração do dieldrin.

Figura 56 - Curva de calibração do DDD.

Figura 57 - Curva de calibração do PCP.

APENDICE II
(Cromatogramas)

Figura 58 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1 após três dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.

Figura 59 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.

Figura 60 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5 após três dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose.

Figura 61 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO_3 .

Figura 62 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO_3 e 0,1% de RL.

Figura 63 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de dieldrin por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 .

Figura 64 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1 após 3 dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.

Figura 65 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.

Figura 66 – Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS5 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 0,5% de glicose.

Figura 67 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO_3 .

Figura 68 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO_3 e 0,1% de RL.

Figura 69 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de DDD por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 .

Figura 70 – Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS1 após 3 dias de incubação: NaNO_3 e 1% de glicose.

Figura 71 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS4 após 3 dias de incubação: NH_4NO_3 e 1% de glicose.

Figura 72 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS6 após 28 dias de incubação: NaNO₃.

Figura 73 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS7 após 28 dias de incubação: NaNO₃ e 0,1% de RL.

Figura 74 - Cromatograma (CG/MS) do extrato obtido na biodegradação de PCP por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 em meio MS8 após 14 dias de incubação: NH_4NO_3 .

APENDICE III
(Espectros de massas)

Figura 75 - (a) Espectro de massas do pico 1 observado em 5 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (decano).

Figura 76 - (a) Espectro de massas do pico 2 observado em 7,5 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (decano).

Figura 77 - (a) Espectro de massas do pico 3 observado em 8,1 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (heptano).

Figura 78 - (a) Espectro de massas do pico 4 observado em 10,2 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (dodecano).

Figura 79 - (a) Espectro de massas do pico 5 observado em 23 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (8-hexadecenal).

Figura 80 - (a) Espectro de massas do pico 6 observado em 23,1 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (dietil ftalato).

Figura 81 – (a) Espectro de massas do pico 7 observado em 23,35 minutos e (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido *trans*-2-dodecanóico).

Figura 82 - (a) Espectro de massas dos picos 8 e 9 observado em 38 e 38,1 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca para o pico em 38 minutos (fenazina ácido carboxílico) e (c) espectro de massas do composto sugerido para o pico em 38,1 minutos (fenazina).

Figura 83 - (a) Espectro de massas do pico 10 observado em 40,9 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (oxirano).

Figura 84 - (a) Espectro de massas do pico 11 observado em 21,9 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido decanóico).

Figura 85 - (a) Espectro de massas do pico 12 observado em 30,8 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido ascórbico).

Figura 86 - (a) Espectro de massas do pico 13 observado em 34,3 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (ácido 9-octadecanóico).

Figura 87 - (a) Espectro de massas do pico 14 observado em 4 minutos; (b) espectro de massas do composto sugerido pela biblioteca (pentanona).